

**MARIANA SERPELONI**

**IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA EXPORTAÇÃO  
DE RNA MENSAGEIRO DO NÚCLEO PARA O CITOPLASMA EM**

*Trypanosoma cruzi*: **Caracterização funcional de TcSub2**

Dissertação apresentada como requisito à obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – Área Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Dra. Andréa Rodrigues Ávila

Co-Orientador: Dr. Federico Guillermo Hoffman

**CURITIBA**

**MARÇO - 2010**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR  
E  
INSTITUTO CARLOS CHAGAS

**IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA EXPORTAÇÃO  
DE RNA MENSAGEIRO DO NÚCLEO PARA O CITOPLASMA EM**  
*Trypanosoma cruzi*: **Caracterização funcional de TcSub2**

**MARIANA SERPELONI**

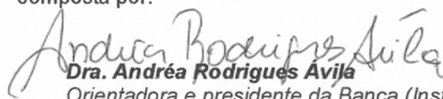
CURITIBA - 2010

# PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

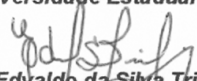
Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia  
Setor de Ciências Biológicas  
Universidade Federal do Paraná  
Instituto de Biologia Molecular do Paraná

## PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:

  
**Dra. Andréa Rodrigues Avila**  
Orientadora e presidente da Banca (Instituto Carlos Chagas – ICC)

  
**Dra. Sueli Fumie Yamada Ogatta**  
(Universidade Estadual de Londrina - UEL)

  
**Dr. Edvaldo da Silva Trindade**  
(Universidade Federal do Paraná - UFPR)

Como Suplentes:

**Dra. Daniela Parada Pavoni**  
(Instituto Carlos Chagas - ICC)

**Dr. Wanderson Duarte da Rocha**  
(Universidade Federal do Paraná – UFPR)

Após argüir o(a) mestrando(a) **Mariana Serpeloni** em relação ao seu trabalho de dissertação intitulada: “**Identificação e caracterização de proteínas envolvidas na exportação de mRNA do núcleo para o citoplasma em *Trypanosoma cruzi***”, é de parecer favorável à **Aprovação** do(a) acadêmico(a), habilitando-o(a) ao título de **Mestre** em Biologia Celular e Molecular, área de concentração em Biologia Celular e Molecular.

A obtenção do título de Mestre está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas nas Normas Internas deste curso de pós-graduação.

  
**Silvio Sanches Veiga**  
Coordenador do Curso

Curitiba, 30 de março de 2010



**A minha família Walter, Marilena e Fernanda Serpeloni que me incentivam em todos os momentos e sempre me fizeram acreditar que os obstáculos se tornam apenas etapas do plano quando há um objetivo a ser alcançado. Ao meu namorado André Luis Bombo pelo amor, companheirismo, paciência e disposição para ajudar em todos os momentos.**

"EU NÃO PROCURO SABER AS RESPOSTAS,  
PROCURO COMPREENDER AS PERGUNTAS."

**Confúcio**

## AGRADECIMENTOS

A Dra. Andréa Rodrigues Ávila pela orientação. Agradeço pela oportunidade, paciência, alegria contagiante, competência e confiança em meu trabalho.

A Dra. Sueli Fumie Yamada Ogatta por ter me apresentado a Biologia Molecular, bem como ter me indicado para realizar o Mestrado no Instituto Carlos Chagas – ICC.

Ao Dr. Federico Guillermo Hoffman pela co-orientação e paciência em ensinar e discutir os resultados de filogenia. Ao doutorando Newton de Medeiros Vidal pela ajuda da parte de bioinformática para obtenção dos resultados de filogenia. Agradeço pelos ensinamentos e colaboração essencial nas discussões dos resultados.

Ao Dr. Stênio Perdigão Fragoso pela paciência, ensinamentos e interesse em ajudar em cada etapa.

A todos do Laboratório *System Biology of Pathogens* – IPK pelo acolhimento e amizade no outro lado do mundo. Agradeço ao Dr. Lucio Freitas-Junior e Dra. Carolina Borsoi Moraes pela orientação e dedicação a este trabalho. Agradeço à Dra. Carolina também pela correção da dissertação.

Ao Dr. Maurílio pelos ensinamentos de microscopias e correção da dissertação.

À Dra. Maria Cristina Motta pela colaboração e discussão dos resultados de microscopia eletrônica.

Ao Dr. Wanderson Duarte da Rocha pela colaboração e ensinamentos sobre *Trypanosoma brucei*.

A todos do Laboratório de Regulação da Expressão Gênica: Dr. Samuel Goldenberg, Dr. Augusto Savio Peixoto Ramos, Dr. Bruno Dallagiovana Muniz, Dra. Andréa Rodrigues Ávila, Sharon, Lys, Elô, Fer, Haruo, Pri Hira, Flávia e Stéphanie pela amizade e ajuda em todas as etapas.

A todos do Lab2 (Laboratório de Biologia Molecular de Tripanossomatídeos): Dr. Stênio Perdigão Fragoso, Lauro, Odinéia, Alda, Flavinha, Fernando, Dani, Rô, Marcinha e Didi pela amizade e ajuda.

Ao todos do Laboratório de Biologia Básica de Células-tronco e Lab 1 (Laboratório de Genômica Funcional) pela amizade e ajuda.

Ao pessoal do Lab 3 (Laboratório de Virologia Molecular), em especial Luana e Daisy pela amizade e ajuda.

Ao Nilson, Vanessa, Tânia, Jana, Diego e Rafael por proporcionar a organização ideal, facilitando a realização deste trabalho.

Aos meus pais Marilena e Walter e irmã, Fernanda, pelo apoio emocional, compreensão e carinho durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Ao André Luis Bombo pelo amor, apoio nas horas difíceis e pela alegria durante todos esses anos. Agradeço também pela paciência em ajudar nas figuras deste trabalho.

À Zan, Lina e Pauleka pela amizade sincera.

# SUMÁRIO

<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
1.1. <i>Trypanosoma cruzi</i> ( <i>T. cruzi</i> ) E A DOENÇA DE CHAGAS .....	1
1.2. EXPRESSÃO E REGULAÇÃO GÊNICA DE TRIPANOSSOMATÍDEOS .....	4
1.3. EXPORTAÇÃO DE mRNA EM EUCARIOTOS: DO NÚCLEO CELULAR AO CITOPLASMA .....	8
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>17</b>
2.1. OBJETIVO GERAL .....	17
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	17
<b>3. Materiais e Métodos .....</b>	<b>19</b>
3.1. IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS E ANÁLISES DE GENÔMICA COMPARATIVA .....	19
3.1.1. Identificação de proteínas componentes da via de exportação de diferentes tipos de RNA através de evidências experimentais na literatura.....	19
3.1.2. Análises comparativas por alinhamento de proteínas através de BLASTP .....	19
3.1.3. Análise comparativa utilizando-se dados de sintonia genômica presentes no TritypDB.....	23
3.2. PREDIÇÃO ESTRUTURAL DE PROTEÍNAS UTILIZANDO-SE O PROGRAMA DE BANCOS DE DADOS DE ESTRUTURAS TRIDIMENSIONAIS PDB E MODELLER.....	24
3.3. SOLUÇÕES E TAMPÕES .....	24
3.4. MICRORGANISMOS.....	26
3.4.1. <i>Escherichia coli</i> .....	26
3.4.2. <i>T. cruzi</i> clone Dm28c (GOLDENBERG et al., 1984) .....	26
3.4.3. <i>Trypanosoma brucei</i> cepa 29-13 (WIRTZ et al., 1998).....	27
3.5. MEIOS DE CULTURA .....	27
3.6. METACICLOGÊNESE IN VITRO .....	29
3.7. OBTENÇÃO DE DNA GENÔMICO DE <i>T. cruzi</i> Dm28c (FRAGOSO E GOLDENBERG, 1992).....	30
3.8. PREPARAÇÃO DE BACTÉRIAS CÁLCIO-COMPETENTES.....	30
3.9. TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS CÁLCIO-COMPETENTES .....	31
3.10. PCR DE COLÔNIA .....	31
3.11. VERIFICAÇÃO DE CLONAGEM PELO MÉTODO DE PALITAGEM (TOOTHPICK) .....	32
3.12. TRANSFEÇÃO E SELEÇÃO DE PARASITAS .....	32
3.12.1. Transfecção de <i>T. cruzi</i> por eletroporação e seleção dos transfectantes.....	32
3.12.2. Transfecção de <i>T. brucei</i> por eletroporação e seleção dos transfectantes .....	33
3.13. CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE PROTEÍNAS POR MÉTODOS DE LOCALIZAÇÃO CELULAR EM <i>T. cruzi</i> .....	34
3.13.1. Expressão e purificação de proteínas recombinantes em <i>Escherichia coli</i> .....	34
3.13.1.1. Indução da expressão de proteínas recombinantes através de IPTG.....	38
3.13.1.2. Enriquecimento protéico através de lavagens com uréia e purificação de proteínas recombinantes através de coluna de Ni-NTA e gel preparativo. ....	39
3.13.2. Obtenção de antisoro policlonal através de inoculação de proteína recombinante em coelhos e camundongos.....	40
3.13.3. Ensaio de <i>Western blot</i> (TOWBIN; STAEBELIN; GORDON, 1979).....	40
3.13.3.1. Ensaio de <i>Western blot</i> através de revelação por fosfatase alcalina .....	41
3.13.3.2. Ensaio de <i>Western blot</i> através de revelação por peroxidase (Quimioluminescência).....	41
3.13.4. Expressão e localização celular de proteína fusionada a GFP N-terminal em <i>T. cruzi</i> .....	42
3.13.5. Imunolocalização celular por microscopia ótica de fluorescência e confocal .....	43
3.13.5.1. Marcação de RNA nascente in situ por incorporação de BrUTP .....	44
3.13.6. Localização celular por imunocitoquímica ultraestrutural .....	45
3.14. CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE PROTEÍNAS POR ABORDAGENS DE GENÉTICA REVERSA .....	46
3.14.1. Avaliação da viabilidade de manipulação por nocaute gênico em <i>T. cruzi</i> .....	46
3.14.1.1. Clonagem de região upstream em vetor pBlueScript-NEO .....	49
3.14.1.2. Clonagem de região downstream em clone pBS-UPS-NEO .....	50
3.14.1.3. Clonagem de região upstream em vetor pBlueScript-HIGRO .....	51



3.14.1.4. Clonagem de região downstream em clone pBS-UPS-HIGRO.....	52
3.14.1.5. Verificação de nocaute gênico por <i>Southern blot</i> (SOUTHERN, 1975) e <i>Western blot</i> .....	53
3.14.2. Análise do fenótipo causado pelo silenciamento, por interferência de RNA (RNAi), de genes de <i>T. brucei</i> ortólogos aos genes identificados em <i>T. cruzi</i> .....	55
<b>4. Resultados.....</b>	<b>61</b>
4.1. IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA EXPORTAÇÃO DE RNA EM ORGANISMOS BASAIS, ENTRE ELES <i>T. cruzi</i> , ATRAVÉS DE ANÁLISES DE GENÔMICA COMPARATIVA. ....	61
4.2. ANÁLISE DE CONSERVAÇÃO DE DOMÍNIOS FUNCIONAIS DE TcSub2 ATRAVÉS DE MODELAGEM MOLECULAR POR HOMOLOGIA ESTRUTURAL.....	69
4.3. CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE TcSub2 POR MÉTODOS DE LOCALIZAÇÃO CELULAR EM <i>T. cruzi</i> .....	71
4.3.1 TcSub2 é uma proteína exclusivamente nuclear.....	78
4.3.2 TcSub2 está associada a sítios de transcrição de mRNA.....	81
4.4. AVALIAÇÃO DE VIABILIDADE DE MANIPULAÇÃO POR NOCAUTE GÊNICO DE TcSub2.....	86
4.4.1. Clonagem de regiões intergênicas de TcSub2 em vetores pBS-NEO e pBS-HIGRO.....	87
4.4.1.1. Amplificação da região upstream de TcSub2 para clonagem em vetor pBS-NEO e pBS-HIGRO.....	87
4.4.1.1.1. Clonagem de região upstream de TcSub2 em vetor pBS-NEO e pBS-HIGRO.....	88
4.4.1.1.2. Amplificação da região downstream de TcSub2.....	89
4.4.1.2.1. Clonagem da região downstream de TcSub2 nos vetores pBS-UPS-NEO e pBS-UPS-HIGRO.....	90
4.4.2. Verificação do Nocaute de um alelo do gene TcSub2 através de substituição por gene de resistência à Neomicina.....	94
4.5. OBTENÇÃO DE TRANSFECTANTES DE <i>T. brucei</i> PARA ENSAIOS DE INTERFERÊNCIA DE RNA.....	98
<b>5. Discussão.....</b>	<b>104</b>
<b>6. Conclusões.....</b>	<b>117</b>
<b>7. Perspectivas.....</b>	<b>118</b>
<b>8. Referências bibliográficas.....</b>	<b>119</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> MECANISMO DE <i>TRANS-SPLICING</i> .....	6
<b>FIGURA 2.</b> EXEMPLOS DE PROTEÍNAS QUE POSSUEM DOMÍNIO LRR. ....	9
<b>FIGURA 3.</b> DESENHO ESQUEMÁTICO DO TRANSPORTE DE MACROMOLÉCULAS PELO CICLO DE RAN EM HUMANOS. A: PROCESSOS DE EXPORTAÇÃO E IMPORTAÇÃO MEDIADOS POR B-CARIOFERINAS. OS DOIS COMPLEXOS .....	11
<b>FIGURA 4.</b> DIFERENTES VIAS DE EXPORTAÇÃO DE RNAs EM LEVEDURAS. ....	12
<b>FIGURA 5.</b> CONSERVAÇÃO DO COMPLEXO TREX: PROTEÍNAS HOMÓLOGAS EM DIFERENTES ORGANISMOS. ....	13
<b>FIGURA 6.</b> RECRUTAMENTO COTRANSCRICIONAL DO COMPLEXO TREX EM FUNGOS .....	13
<b>FIGURA 7.</b> RECRUTAMENTO EM HUMANOS DO COMPLEXO TREX DURANTE O <i>SPLICING</i> .....	14
<b>FIGURA 8.</b> PAPEL DAS PROTEÍNAS SR NA EXPORTAÇÃO DE mRNA EM HUMANOS. ....	15
<b>FIGURA 9.</b> EXPORTAÇÃO DE mRNA É ACOPLADO À TRANSCRIÇÃO E PROCESSAMENTO EM FUNGOS .....	16
<b>FIGURA 10.</b> ÁRVORE FILOGENÉTICA DE EUCARIOTOS UTILIZADOS NESTE ESTUDO .....	22
<b>FIGURA 11.</b> MAPA DO VETOR DE ENTRADA pDONR™221 (INVITROGEN).....	35
<b>FIGURA 12.</b> SEQUÊNCIAS DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES SINTETIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DO GENE TcSub2.....	35
<b>FIGURA 13.</b> MAPA DO VETOR pDEST™17 (INVITROGEN) DE EXPRESSÃO DE GENES EM BACTÉRIAS .....	37
<b>FIGURA 14.</b> ESQUEMA DE VETORES E CONSTRUÇÃO PARA A ESTRATÉGIA DE NOCAUTE EM <i>T. CRUZI</i> . ....	47
<b>FIGURA 15.</b> OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS .....	48
<b>FIGURA 16.</b> MAPA DO VETOR p2T7-177 .....	56
<b>FIGURA 17.</b> REGIÕES UTILIZADAS PARA DESENHO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES DAS REGIÕES TbSub2A e TbSub2B. ....	57
<b>FIGURA 18.</b> MAPA DO VETOR pGEM® – TEASY UTILIZADO PARA AS SUBCLONAGENS. ....	58
<b>FIGURA 19.</b> VERIFICAÇÃO DA CONSERVAÇÃO DE TcSub2 AO LONGO DA FILOGENIA DE EUCARIOTOS ATRAVÉS DE ALINHAMENTO MÚLTIPLO DE ESTRUTURAS PRIMÁRIAS DE PROTEÍNAS SIMILARES A TcSub2 DE ORGANISMOS-MODELO E TRIPANOSSOMATÍDEOS .....	67
<b>FIGURA 20.</b> ANÁLISE DE SINTENIA DE TcSub2 EM <i>LEISHMANIA SPP</i> E <i>T. BRUCEI</i> .....	68
<b>FIGURA 21.</b> ESQUEMA REPRESENTATIVO DOS DOMÍNIOS DA SUPERFAMÍLIA DEXDC-HELICASES .....	69
<b>FIGURA 22.</b> ANÁLISE DE CONSERVAÇÃO DE MOTIVOS DA PROTEÍNA TcSub2 .....	70
<b>FIGURA 23.</b> ESTRUTURA TERCIÁRIA DE TcSub2 E HsaUAP56 .....	70
<b>FIGURA 24.</b> PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DE PCR PARA CONFIRMAÇÃO DE CLONAGEM DE TcSub2 EM VETOR pDONR™221 .....	71
<b>FIGURA 25.</b> PERFIL ELETROFORÉTICO DE MINIPREPARAÇÃO DO PLASMÍDEO CORRESPONDENTE AO CLONE pDEST™17-TcSub2 .....	72
<b>FIGURA 26.</b> PERFIL ELETROFORÉTICO EM GEL SDS-PAGE 10 % DE INDUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE TcSub2 E TESTE DE SOLUBILIDADE .....	73
<b>FIGURA 27.</b> PERFIL ELETROFORÉTICO EM GEL SDS-PAGE 15% DE FRAÇÃO INSOLÚVEL ENRIQUECIDA COM A PROTEÍNA RECOMBINANTE TcSub2.....	74
<b>FIGURA 28.</b> PERFIL ELETROFORÉTICO EM GEL SDS-PAGE 15% DAS FRAÇÕES OBTIDAS ATRAVÉS DE CROMATOGRAFIA EM RESINA DE NÍQUEL .....	74
<b>FIGURA 29.</b> PERFIL ELETROFORÉTICO EM GEL SDS-PAGE 15% DE PROTEÍNA RECOMBINANTE TcSub2 ELETROELUIDA. ....	75
<b>FIGURA 30.</b> ANÁLISE POR <i>WESTERN BLOT</i> PARA TESTE DE ESPECIFICIDADE DO ANTISORO DE CAMUNDONGO ANTI-TcSub2 EM EXTRATOS PROTÉICOS DE <i>T. CRUZI</i> .....	75
<b>FIGURA 31.</b> ANÁLISE POR <i>WESTERN BLOT</i> PARA TESTE DE ESPECIFICIDADE DO ANTISORO DE CAMUNDONGO ANTI-TcSub2 EM EXTRATOS PROTÉICOS DE <i>T. BRUCEI</i> .....	76
<b>FIGURA 32.</b> ANÁLISE POR <i>WESTERN BLOT</i> PARA VERIFICAÇÃO DO PERFIL DA PROTEÍNA TcSub2 AO LONGO DA METACICLOGÊNESE DE <i>T. CRUZI</i> .....	77
<b>FIGURA 33.</b> ANÁLISE POR <i>WESTERN BLOT</i> PARA TESTE DE ESPECIFICIDADE DO ANTISORO DE COELHO ANTI-TcSub2 EM EXTRATOS PROTÉICOS DE <i>T. CRUZI</i> .....	78
<b>FIGURA 34.</b> PERFIL ELETROFORÉTICO DA ANÁLISE DE CLONAGEM DO GENE TcSub2 EM VETOR pTcPR-GFPN POR PCR DE COLÔNIA .....	79
<b>FIGURA 35.</b> LOCALIZAÇÃO NUCLEAR DE TcSub2 FUSIONADA A GFP EM VETOR pTcPR-GFPN-TcSub2 DE SUPEREXPRESSÃO EM <i>T. CRUZI</i> .....	80
<b>FIGURA 36.</b> LOCALIZAÇÃO NUCLEAR DA PROTEÍNA TcSub2 EM <i>T. CRUZI</i> POR IMUNOFLOUORESCÊNCIA ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ÓTICA DE FLUORESCÊNCIA. ....	81
<b>FIGURA 37.</b> ANÁLISE DE DISTRIBUIÇÃO NUCLEAR DE TcSub2 EM <i>T. CRUZI</i> POR IMUNOCITOQUÍMICA ULTRAESTRUTURAL. ....	82
<b>FIGURA 38.</b> ANÁLISE NUCLEAR DE COLOCALIZAÇÃO DA PROTEÍNA TcSub2 COM SÍTIOS ATIVOS DE TRANSCRIÇÃO ATRAVÉS DE DETECÇÃO DE RNAs NASCENTES EM <i>T. CRUZI</i> .....	83

<b>FIGURA 39.</b> ANÁLISE NUCLEAR DE COLOCALIZAÇÃO DA PROTEÍNA TcSUB2 COM SÍTIOS ATIVOS DE TRANSCRIÇÃO DE RNA POLIMERASE I ATRAVÉS DE DETECÇÃO DE RNAs NASCENTES EM <i>T. CRUZI</i> .	85
<b>FIGURA 40.</b> ANÁLISE NUCLEAR DE AUSÊNCIA DE TcSUB2 EM NÚCLEOLO DE <i>T. CRUZI</i> POR IMUNOCITOQUÍMICA ULTRAESTRUTURAL.	86
<b>FIGURA 41.</b> PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DE PCR DE REGIÕES INTERGÊNICAS <i>UPSTREAM</i> DE TcSUB2 PARA CLONAGEM EM VETORES PBS-NEO E PBS-HIGRO	87
<b>FIGURA 42.</b> PERFIL ELETROFORÉTICO DO VETOR PBS-NEO E PBS-HIGRO APÓS PROCESSAMENTO PELO MÉTODO DE PALITAGEM DAS COLÔNIAS DE BACTÉRIAS DH5A TRANSFORMADAS COM AS RESPECTIVAS LIGAÇÕES	88
<b>FIGURA 43.</b> PERFIL ELETROFORÉTICO DA ANÁLISE DE CLONAGEM DE REGIÃO INTERGÊNICA <i>UPSTREAM</i> DE TcSUB2 EM VETOR PBS-NEO E PBS-HIGRO POR PCR.	89
<b>FIGURA 44.</b> PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DE PCR DE REGIÕES INTERGÊNICAS <i>DOWNSTREAM</i> DE TcSUB2 PARA CLONAGEM EM VETORES PBS-UPS-NEO E PBS-UPS-HIGRO	90
<b>FIGURA 45.</b> PERFIL ELETROFORÉTICO DO VETOR PBS-NEO APÓS PROCESSAMENTO PELO MÉTODO DE PALITAGEM DAS COLÔNIAS DE BACTÉRIAS DH5A TRANSFORMADAS COM LIGAÇÃO PBS-UPS-NEO/DOWN.	91
<b>FIGURA 46.</b> PERFIL ELETROFORÉTICO DA ANÁLISE DE CLONAGEM DAS REGIÕES INTERGÊNICAS <i>UPSTREAM</i> E <i>DOWNSTREAM</i> DE TcSUB2 FLANQUEADORAS DO GENE DE NEO, POR PCR	91
<b>FIGURA 47.</b> PERFIL ELETROFORÉTICO DA ANÁLISE DE CLONAGEM DA REGIÃO INTERGÊNICA <i>DOWNSTREAM</i> DE TcSUB2 EM CLONE PBS-UPS-HIGRO POR PCR DE COLÔNIA.	92
<b>FIGURA 48.</b> PERFIL ELETROFORÉTICO DA ANÁLISE DE CLONAGEM DAS REGIÕES INTERGÊNICAS <i>UPSTREAM</i> E <i>DOWNSTREAM</i> DE TcSUB2 FLANQUEADORAS DO GENE DE HIGRO, POR PCR	93
<b>FIGURA 49.</b> PERFIL ELETROFORÉTICO DE CAMPO PULSADO EM GEL DE AGAROSE 1,2 % APÓS COLORAÇÃO COM SOLUÇÃO DE BROMETO DE ETÍDEO.	94
<b>FIGURA 50.</b> ENSAIO DE HIBRIDAÇÃO POR <i>SOUTHERN BLOT</i> .	95
<b>FIGURA 51.</b> QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNA TcSUB2 EM POPULAÇÃO CLONAL DE <i>T. CRUZI</i> SIMPLES NOCAUTE (KO).	96
<b>FIGURA 52.</b> CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>T. CRUZI WILD TYPE</i> E NOCAUTE (KO SUB2) DURANTE A FASE EXPONENCIAL DE CRESCIMENTO	97
<b>FIGURA 53.</b> PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DE PCR DOS FRAGMENTOS TbSUB2A E TbSUB2B PARA SUBCLONAGEM EM VETOR PGEM- <i>TEASY</i>	98
<b>FIGURA 54.</b> PERFIL ELETROFORÉTICO DE DIGESTÃO DOS CLONES PGEM-TbSUB2A E PGEM-TbSUB2B.	99
<b>FIGURA 55.</b> PERFIL ELETROFORÉTICO DA ANÁLISE DE CLONAGEM DOS FRAGMENTOS TbSUB2A E TbSUB2B EM VETOR p2T7-177 POR PCR DE COLÔNIA	100
<b>FIGURA 56.</b> PERFIL ELETROFORÉTICO DE p2T7-177-GFP E CLONES p2T7-177-TbSUB2A E p2T7-177-TbSUB2B, COM AS RESPECTIVAS DIGESTÃO POR <i>NotI</i> .	100
<b>FIGURA 57.</b> CURVA DE CRESCIMENTO E MORFOLOGIA DE TRANSFECTANTES DE <i>T. BRUCEI</i> p2T7-177-GFP E p2T7-177-TbSUB2A APÓS A INDUÇÃO DE SILENCIAMENTO DO GENE TbSUB2 POR TETRACICLINA.	102
<b>FIGURA 58.</b> ANÁLISE DE CONFIRMAÇÃO DO SILENCIAMENTO DA PROTEÍNA TbSUB2 APÓS 24 E 48 HORAS APÓS INDUÇÃO POR TETRACICLINA POR <i>WESTERN BLOT</i> .	103

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1.</b> Espécies utilizadas para análises de conservação de proteínas.....	21
<b>TABELA 2.</b> Critérios utilizados para a classificação dos resultados de alinhamentos de proteínas por BLASTP ..	23
<b>TABELA 3.</b> Lista de proteínas de <i>S. cerevisiae</i> (Sce) e <i>H. sapiens</i> (Hsa) utilizadas como <i>queries</i> , organizadas por vias de exportação de RNA .....	63
<b>TABELA 4.</b> Análise comparativa de conservação de proteínas envolvidas na via de exportação de RNAs dependente de exportinas e RanGTP ao longo da filogenia de eucariotos. ....	64
<b>TABELA 5.</b> Análise comparativa de sequências de proteínas envolvidas na via de exportação de mRNAs ao longo da filogenia de eucariotos.....	65

## LISTA DE ABREVIATURAS

BCIP - 5-bromo 4-cloro 3-indolil fosfato  
BLASTP- *Basic Local Alignment Search Tool Program*  
BSA - Albumina sérica bovina  
DAPI - 4'-6-diamidino-2-fenilindol  
Dm - *Didelphis marsupialis*  
DNA - Ácido desoxirribonucléico  
dNTP - Desoxirribonucleotídeo  
D.O. - Densidade Óptica  
EDTA - Ácido etileno-diamino-tetracético  
G418 - Antibiótico aminoglicosídeo relacionado à gentamicina  
GAP - Proteína ativadora de GTPase (*GTPase-activation protein*)  
GEF - Fator de substituição por GTP (*Guanine nucleotide exchange factor*)  
GFP - Proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein*)  
HEPES - Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2'-etanossulfônico  
HSP - *High-scoring Segment Pair*  
ICC - Instituto Carlos Chagas  
IgG - Imunoglobulina G  
IPTG - Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo  
kDa - kilo-Dalton  
LB - Meio Luria-Bertani  
LECA – *Last Eukaryotic Common Ancestor*  
LIT - Meio Infusão de fígado e triptose (*Liver Infusion Tryptose*)  
LRR - *Leucine Rich Repeat*  
miRNA - micro RNAs  
mRNA - RNA mensageiro  
mRNP – Complexo ribonucleoprotéico  
NES - *Nuclear Export Signal*  
NLS - *Nuclear Localization Signal*  
PBS - Solução salina tamponada com fosfato (*Phosphate Buffered Saline*)  
PCR - Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)  
PFA - Paraformaldeído

PMSF - Fluoreto de fenil metil sulfonil

PSG - Tampão salina fosfato com glicose (*Phosphate Saline Glucose*)

Q - *Query*

RBP – Proteínas de ligação a RNA (*RNA binding proteins*)

RNA - Ácido ribonucléico

rRNA- RNA Ribossomal

S - *Subject*

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

SL-RNA – RNA *Spliced-Leader*

snRNA- pequenos RNAs nucleares

snoRNA -pequenos RNAs nucleolares

TAU - Meio Urina artificial de Triatomíneo (*Triatomine Artificial Urine*)

TBE - Tampão Tris-Borato-EDTA

TRIS - Tris-hidroximetil aminometano

tRNA - RNA transportador

Tween 20 - Monolaurato de polioxietileno (20) sorbitana

UTR - Região não traduzida (*Untranslated region*)

VSG - Glicoproteína variável de superfície (*Variable Surface Glycoprotein*)

X-gal - 5-bromo-4-cloro-3-indol- $\beta$ -D-galactopiranosídeo

## LISTA DE SÍMBOLOS

°C - Grau Celsius

% - Porcentagem

cm - centímetro

μF - MicroFaraday

μg - Micrograma

μL - Microlitro

μM - Micromolar

g - Grama (unidade de medida de massa)

*g* - Aceleração de gravidade

kDa - QuiloDalton

L - litro

M - Molar

mg - Miligrama

mL - Mililitro

mM - Milimolar

ng - Nanograma

nm - Nanômetro

bp - Pares de bases

pH - Potencial hidrogeniônico

U - Unidade

V-Volt

## RESUMO

Diferentes espécies de RNAs são exportadas do núcleo por vias especializadas em eucariotos. Nos eucariotos superiores a exportação nuclear da maioria das espécies de RNAs, como microRNAs (miRNAs), rRNAs, pequenos RNAs nucleares RNAs (snRNAs) e RNA transportadores (tRNAs), seguem o modelo de transporte via exportinas e RanGTP, onde exportinas específicas estão envolvidas com diferentes vias de exportação. No entanto, a exportação nuclear da maioria dos RNAs mensageiros (mRNAs) não segue a via dependente de RanGTP. A maquinaria de exportação de mRNAs está altamente integrada com o processamento de mRNA e inclui um conjunto específico de adaptadores de transporte, proteínas ligadoras de RNAs (RBPs), RNA helicases e proteínas associadas ao complexo de poro nuclear (NPC). Ainda não se sabe se as vias de exportação de RNAs estão conservadas em eucariotos pertencentes às linhagens basais e a pergunta de como o complexo de exportação de RNAs era no eucarioto ancestral (LECA) ainda permanece em aberto. Um dos nossos objetivos foi reconstruir a história evolutiva de diferentes vias de exportação de RNAs em eucariotos. Para isso, nós investigamos o genoma de eucariotos para a busca de proteínas homólogas envolvidas na exportação de RNAs em metazoários e fungos, utilizando como sementes de busca as proteínas de humanos e fungos funcionalmente caracterizadas. Os resultados da genômica comparativa indicaram que muitas das proteínas-chave envolvidas em diferentes vias de exportação de RNAs dependente de RanGTP estão conservadas em eucariotos basais e então nós inferimos que ortólogos destas proteínas já estavam presentes em LECA. A exportação de mRNA é a mais complexa em eucariotos e a menos conservada entre essas linhagens basais examinadas neste estudo. Isto sugere que a via de exportação de mRNA em eucariotos basais é diferente do que é observado em eucariotos superiores. Para entender melhor a exportação de mRNAs em linhagens basais de eucariotos, decidimos investigar a função de algumas proteínas altamente conservadas em tripanossomatídeos, agentes causais de doenças humanas fatais. A proteína mais conservada ao longo da filogenia de eucariotos, determinada pela nossa análise, foi Sub<sub>2</sub>/UAP56, um componente do complexo multiprotéico que conecta transcrição com exportação de mRNA; TREX (Transcription/Export). Ela é uma proteína nuclear em *Trypanosoma brucei* e *Trypanosoma cruzi*. Análises de imunocitoquímica ultraestrutural mostraram que a proteína Sub<sub>2</sub> de *T. cruzi* (TcSub2) está localizada em sítios dispersos no núcleo, com ausência de marcação no nucléolo, e na interface entre as áreas de cromatina densa e frouxa, indicando a associação com sítios de transcrição. Este resultado foi analisado por ensaios de incorporação de BrUTP. Observamos que esta proteína colocaliza com sítios de transcrição por RNA Polimerase II, corroborando com os resultados de microscopia eletrônica. Essas evidências sugerem fortemente que TcSub2 participa do metabolismo nuclear de mRNA. Nós estamos atualmente investigando o papel de Sub<sub>2</sub> de *T. cruzi* e *T. brucei* para elucidar se está de fato relacionada com a exportação de mRNAs em tripanossomatídeos. Além disso, o nocaute duplo do gene de TcSub2 é letal em *T. cruzi* e ensaios de interferência de RNA (RNAi) do gene TbSub2 altera o crescimento celular de *T. brucei*, indicando que é uma proteína essencial em tripanossomatídeos, similar em outros eucariotos.



## ABSTRACT

Different RNA species are exported from the nucleus by specialized pathways in eukaryotes. In “higher” eukaryotes, the nuclear export of most RNA species, such as microRNAs (miRNAs), rRNAs, small nuclear RNAs (snRNAs), and transfer RNAs (tRNAs), has been shown to follow the RanGTP-exportin model of transport, and specific exportins are involved with the different export pathways. However, nuclear export of most mRNAs does not follow the RanGTP-exportin pathway. The mRNA export machinery is highly integrated with mRNA processing, and it includes a different set of nuclear transport adaptors plus other mRNA binding proteins, RNA helicases, and nuclear pore complex (NPC) associated proteins. It is not known whether the RNA export pathways are conserved in deeply diverging members of the eukaryotic lineage, and the question of how complex the nucleocytoplasmic export of RNA was in the last eukaryotic common ancestor (LECA) remains open. One of our objectives was to reconstruct the evolutionary history of the different RNA export pathways across eukaryotes. To do so, we screened an array of eukaryotic genomes for the presence of homologs of the proteins involved in RNA export in metazoa and fungi, using human and yeast proteins as queries. Results from our genomic comparisons indicate that several of the key proteins involved in the different Ran-dependent RNA export pathways are conserved across most eukaryotic lineages, and thus we infer that orthologs of them were highly likely to have been already present in LECA. The mRNA export pathway is the most complex and the least conserved among those examined in this study, suggesting that mRNA export among deeply diverging eukaryotic lineages is different from what is observed in extant “higher” eukaryotes. To better understand mRNA export in deeply diverging eukaryote lineages, we decided to investigate the function of some well conserved proteins in trypanosomatid protozoa, causative agents of deadly human diseases. The most conserved protein across all eukaryotes as determined by our analysis was Sub<sub>2</sub>/UAP56, a component of the multiprotein complex that connects transcription with mRNA export, TREX (Transcription/Export). It is a nuclear protein in *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. Ultrastructural immunocytochemistry analysis showed that *T. cruzi* Sub<sub>2</sub> is localized in dispersed foci all over the nuclei, excluding nucleolus, and at the interface between dense and non-dense chromatin areas indicating its association to transcription sites. This result was further analyzed by BrUTP incorporation assays. We observed that this protein is co-localized with RNA pol II transcription sites corroborating our results. Taken together, these evidences strongly suggest that TcSub2 participates in nuclear mRNA metabolism. We are currently investigating the role of *T. cruzi* and *T. brucei* Sub<sub>2</sub> to elucidate if they are in fact components of mRNA export in trypanosomatids. Besides, the double knockout of the TcSub2 gene is lethal in *T. cruzi* and RNA interference assays (RNAi) of TbSub2 causes a growth defect in *T. brucei*, indicating that it is an essential protein for trypanosomes, similar to other eukaryotes.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) e a doença de Chagas

*T. cruzi* (CHAGAS, 1909) é um protozoário flagelado pertencente ao reino Protista, subreino Protozoa, incluído no filo Sarcomastigophora, subfilo Mastigophora, classe Zoomastigophora e ordem Kinetoplastida. Esta ordem abrange protozoários flagelados que possuem uma região especializada conhecida como cinetoplasto, onde reside o DNA mitocondrial, também denominado de kDNA (SHAPIRO; ENGLUND, 1995; TELLERIA *et al.*, 2006). É na ordem Kinetoplastida que é encontrada a família Trypanosomatidae, na qual está presente o gênero *Trypanosoma* (LEVINE *et al.*, 1980). Este gênero constitui um dos mais importantes da família Trypanosomatidae, pois inclui além de *T. cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas (CHAGAS, 1909), outras duas subespécies de *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*) que ocasionam doenças em humanos, *T. brucei rhodesiense* e *T. brucei gambiense*, ambos agentes da doença do sono. Adicionalmente, ainda há *T. brucei brucei*, causador da enfermidade em animais conhecida como nagana (HIDE, 1999).

A doença de Chagas, ou tripanossomíase americana, ocorre principalmente nas Américas, desde o sul dos Estados Unidos até o sul da Argentina e Chile. Segundo a Organização Mundial da Saúde, há cerca de 10 milhões de indivíduos infectados nas Américas, sendo que somente no Brasil há 2 milhões de chagásicos (WHO-Bulletin of the World Health Organization, 2009).

Nesta doença duas fases distintas podem ser observadas: aguda e crônica. A fase aguda inicia-se com a formação de um edema no local de entrada do parasita (chagoma de inoculação) que tende a desaparecer durante o curso da infecção. Este primeiro momento é seguido por um período pré-patente, de tempo variável, no qual os parasitas se multiplicam de forma exponencial (KROPF; AZEVEDO; FERREIRA, 2000). Quando da presença de sintomas, é caracterizada por alta parasitemia e intenso parasitismo tecidual, o que resulta em mal-estar, cefaléia, edema subcutâneo, disfunção cardíaca com miocardite focal, hepatomegalia, esplenomegalia e conjuntivite unilateral (sinal de Romana) (ANDRADE, 1999). A

letalidade pode estar relacionada à meningoencefalite e insuficiência cardíaca (RASSI; RASSI JÚNIOR; RASSI, 2000). Quando a manifestação aguda diminui, segue um período de infecção latente onde eventualmente pode ocorrer miocardite crônica acompanhada de cardiomegalia, arritmia, dispneia e edema periférico sem evidências ou com rápida retomada da multiplicação do parasita (LARANJA; ANDRADE, 1980; ANSELMINI *et al.*, 1966). Os casos agudos podem evoluir para a fase crônica com sintomas (forma determinada), onde os indivíduos doentes apresentam distúrbios cardíacos e digestivos como megaesôfago e megacólon, ou com ausência de sintomas (forma indeterminada) (DIAS, 2000).

*T. cruzi* é um microrganismo heteroxênico, com ciclo biológico alternado entre hospedeiros vertebrados (mamíferos) e invertebrados (triatomíneos). Existem diferentes formas de transmissão da doença, dentre as quais se destaca a via vetorial que consiste na transmissão do parasita por meio das excretas do inseto vetor hematófago pertencente à ordem Hemiptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae. Há cerca de 123 espécies conhecidas de triatomíneos distribuídas em 15 gêneros, sendo que alguns dos gêneros - *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius* - estão relacionados com a transmissão natural da doença (LARANJA *et al.*, 1956). A principal característica biológica dos triatomíneos é que são obrigatoriamente hematófagos e necessitam do repasto sanguíneo para completar o desenvolvimento (DIAS, 2000). O parasita pode ainda ser transmitido aos mamíferos por transfusão sanguínea ou via oral e, com menos frequência, por via congênita, acidentes de laboratório, transplantes de órgãos (TANOWITZ *et al.*, 1992; SCHMUNIS, 2000; BELTRÃO *et al.*, 2009). Praticamente todo tipo de célula nucleada do hospedeiro mamífero pode ser parasitada considerando o tropismo das diferentes cepas (LENZI *et al.*, 1996).

Outra característica deste parasita é apresentar diferentes morfologias durante o ciclo biológico. A classificação de suas formas baseia-se também na posição do cinetoplasto em relação ao núcleo e do local de onde emerge o flagelo (HOARE; WALLACE, 1966). Por exemplo, o flagelo emergindo na extremidade posterior que percorre todo o corpo formando uma membrana ondulante é característica da morfologia tripomastigota. Os tripomastigotas são alongados, possuem cinetoplasto posterior ao núcleo e são as formas infectivas extracelulares, não multiplicativas, encontradas no sangue de hospedeiros vertebrados (tripomastigotas sanguíneos) ou então na porção distal do intestino do inseto vetor

(tripomastigotas metacíclicos). As formas amastigotas são arredondadas ou ovóides e apresentam flagelo que não se exterioriza. A multiplicação destas formas ocorre por fissão binária no interior de células do hospedeiro vertebrado. Já no hospedeiro invertebrado, os epimastigotas são as formas multiplicativas extracelulares, com corpo alongado e cinetoplasto anterior bem próximo ao núcleo (SOUZA, 1999).

A forma infectante para o hospedeiro mamífero no ciclo de transmissão natural é a tripomastigota metacíclica que está presente nas porções distais do intestino de triatomíneos infectados e pode ser eliminada durante o repasto sanguíneo junto às fezes e urina. A penetração dos tripomastigotas metacíclicos pode ocorrer através de mucosas ou descontinuidades da pele de mamíferos, seguido de internalização celular através de pseudópodos das células hospedeiras onde o parasita pode permanecer algumas horas no interior do vacúolo parasitóforo (GARCIA; AZAMBUJA, 1991; SOUZA, 2002; TEIXEIRA; NASCIMENTO; STURM, 2006). A fusão desse vacúolo com os lisossomos leva a um aumento da acidez no interior desta estrutura onde se encontra o parasita, o que inicia o processo de diferenciação na forma amastigota. Paralelamente, ocorre a degradação gradual da membrana vacuolar pela ação de uma enzima secretada pelo parasita, a TcTOX, cuja molécula é semelhante à porina (ANDREWS, 1993).

Uma vez no citoplasma das células, os amastigotas se dividem sucessivamente por fissão binária e iniciam o processo de diferenciação em tripomastigotas sanguíneos (MEYER, de SOUZA, 1976). Depois de cinco dias, em média, as células hospedeiras são rompidas havendo liberação de tripomastigotas que invadem novas células ou se disseminam pela circulação sanguínea para outros órgãos. Os triatomíneos se infectam através da ingestão destas formas sanguíneas, dando continuidade ao ciclo de infecção (SOUZA, 2002). As formas sanguíneas ingeridas pelo triatomíneo se diferenciam em epimastigotas/esferomastigotas no estômago - porção anterior do trato digestivo e se dividem por fissão binária. Uma vez estabelecidas, as formas epimastigotas aderem às membranas perimicrovilares do intestino - porção distal do trato digestivo - diferenciando-se em formas tripomastigotas metacíclicas, que posteriormente são liberadas junto com fezes do triatomíneo (BONALDO *et al.*, 1988; GONZALEZ *et al.*, 1999).

Esse processo de diferenciação celular de formas epimastigotas para tripomastigotas metacíclicas, denominado de metaciclogênese, é uma etapa crucial do ciclo biológico do parasita e pode ocorrer *in vitro* em meio LIT ou em outros meios

de cultura (CAMARGO, 1964; CASTELLANI; RIBEIRO; FERNANDES, 1967; LANAR, 1979; RONDINELLI *et al.*, 1988). Nesses meios, a diferenciação ocasionalmente é acompanhada por multiplicação celular e por isso, Contreras e colaboradores (1985b) desenvolveram condições para metaciclogênese *in vitro* na ausência de multiplicação celular. Por esse método, alta densidade de epimastigotas previamente cultivados em meio LIT são incubados em uma solução ligeiramente hipertônica que se assemelha às condições iônicas encontradas na urina do inseto vetor (TAU). Devido à falta de nutrientes, esta etapa promove um estresse nutricional e desequilíbrio metabólico que afetam o programa de expressão gênica do parasita (GOLDENBERG *et al.*, 1984). Posteriormente, esses protozoários são incubados em meio de diferenciação TAU3AAG (TAU suplementado com L-prolina, L-ácido glutâmico, L-ácido aspártico e glicose), permitindo a diferenciação em tripomastigotas metacíclicos que são liberados no sobrenadante da cultura (GOLDENBERG *et al.*, 1987). Há evidências de que a expressão de genes específicos de tripomastigotas precede as alterações morfológicas deste estágio e as primeiras modificações na expressão de genes ocorrem nas primeiras 24 horas. Com isso, a metaciclogênese *in vitro* pode ser considerada um modelo de estudo para caracterização de genes diferencialmente expressos (CONTRERAS; MOREL; GOLDENBERG, 1985a; ÁVILA *et al.*, 2001).

## **1.2. Expressão e regulação gênica de tripanossomatídeos**

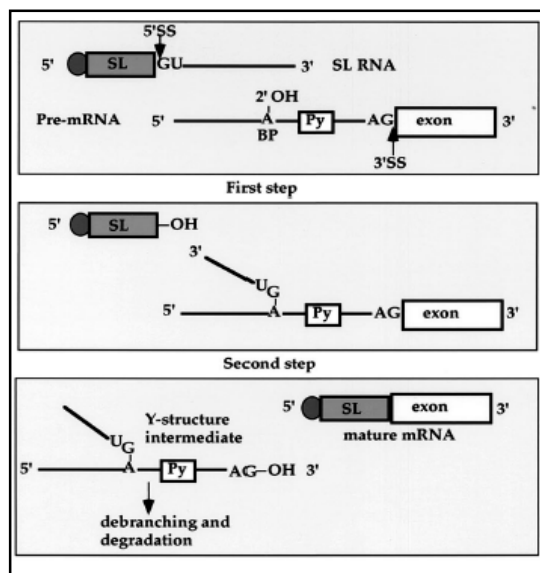
A maturação dos transcritos em parasitas da ordem Kinetoplastida, entre eles os tripanossomatídeos, difere da maioria dos eucariotos (CLAYTON, 2002). As regiões codificadoras estão ordenadas em grupos em uma mesma fita de DNA e na maioria dos casos não apresentam interrupções por íntrons, com exceção do gene que codifica para a enzima poli-A polimerase, relatado em *T. cruzi* e *T. brucei* (MAIR *et al.*, 2000). A transcrição resulta na formação de RNAs denominados policistrônicos que contêm a informação de diversos genes, os quais não possuem necessariamente funções relacionadas (JOHNSON; KOOTER; BORST, 1987; TEIXEIRA; DAROCHA, 2003). Uma peculiaridade neste processo é que genes de um mesmo transcrito policistrônico podem ser expressos em níveis diferentes,

ressaltando a importância de mecanismos pós-transcricionais no controle da expressão gênica (revisto por VANHAMME, PAYS, 1995; CLAYTON e SHAPIRA, 2007).

Outra peculiaridade inclui a diferença observada entre as RNA polimerases dos tripanossomatídeos em relação às de eucariotos superiores que são as alterações na extensão C-terminal da RNA polimerase II (ausência das repetições em *tandem* de heptapeptídeos nos tripanossomas). Há também a susceptibilidade das RNA polimerases dos tripanossomatídeos a diferentes concentrações de inibidores como a  $\alpha$ -amanitina, o que auxilia no estudo funcional destas enzimas *T. brucei* e *T. cruzi*, por exemplo (LAUFER *et al.*, 1999; CAMPBELL; THOMAS; STURM, 2003; DOSSIN; SCHENKMAN, 2005).

Anteriormente ao início da tradução, os transcritos policistrônicos requerem processamento para gerar RNAs mensageiros (mRNAs) maduros e individualizados referentes aos respectivos genes. Neste caso, o processamento é decorrente de um evento denominado *trans-splicing* que adiciona uma sequência conservada na extremidade 5' de cada mRNA e da adição de uma cauda de adeninas (poli-A) na extremidade 3' (LIANG *et al.*, 2003). O *trans-splicing* foi inicialmente caracterizado em tripanossomatídeos em estudos sobre glicoproteínas variáveis de superfície (VSGs) de *T. brucei*, quando foi observado que os mRNAs apresentavam aproximadamente 39 nucleotídeos observados na extremidade 5', denominada então de sequência líder - *spliced leader* (SL), ou mini-exon (BOOTHROYD; GROSS, 1982; NELSON *et al.*, 1983). Posteriormente, a presença de sequências homólogas de SL foram observadas em transcritos de outros tripanossomatídeos como *T. cruzi* e *Leptomonas collosoma* (NELSON *et al.*, 1983; DE LANGE *et al.*, 1984). O SL origina-se de um transcrito de aproximadamente 141 nucleotídeos e é adicionado na porção 5' da sequência codificante presente nos RNAs policistrônicos precursores, originando unidades monocistrônicas que serão traduzidas (VAN DER PLOEG *et al.*, 1982). Como pode ser observado na figura 1, uma porção rica em polipirimidinas, crucial para o processo de *trans-splicing*, está localizada na região intergênica que precede o sítio de adição de SL do pré-mRNA (HUG *et al.*, 1994). A adição de SL é direcionada pela região aceptora de SL-RNA que possui o dinucleotídeo AG na região 3' da região do RNA policistrônico primário que será removida (LEBOWITZ *et al.*, 1993; MATTHEWS; TSCHUDI; ULLU, 1994). Sabe-se também que a conservação da distância entre a região aceptora - 3'AG - e a região

de poliadenilação é importante para que o processamento ocorra corretamente, revelando assim o papel de regiões intergênicas na regulação do *trans-splicing* (revisto por TEIXEIRA, 1998) e consequentemente na expressão gênica nestes organismos.



**Figura 1. Mecanismo de *trans-splicing*.** Estão indicadas a região 5'GU no sítio de clivagem do SL-RNA e a região aceptora 3'AG presente no pré-mRNA. BP: ponto de ramificação. Py: região rica em polipirimidina (FONTE: LIANG *et al.*, 2003).

As características peculiares na estrutura de genes e transcrição do RNA fazem com que a regulação da expressão gênica em tripanossomatídeos seja praticamente, se não exclusivamente pós-transcricional, diferente da maioria dos eucariotos superiores, onde é evidente a importância de um controle transcricional complementando os controles em nível pós-transcricional. Neste último caso, proteínas de ligação a RNA (RBPs) possuem um papel principal (revisto por DREYFUSS; KIM; KATAOKA, 2002) e originam complexos ribonucleoproteicos (mRNPs) que direcionam o mRNA ao citoplasma para tradução ou degradação (KEENE, 2001). Além disso, as RBPs participam de diferentes eventos moleculares como *splicing* alternativo, poliadenilação, exportação, localização, tradução e estabilidade de mRNAs (revisto por GLISOVIC *et al.*, 2008).

Os tripanossomatídeos também possuem proteínas de ligação a RNA como protagonistas na regulação da expressão gênica (D'ORSO, DEGAUDENZI; FRASCH, 2003, DEGAUDENZI; FRASCH; CLAYTON, 2005, CARO *et al.*, 2006), como por exemplo, PABP1, TcUBP1, TcSR, p34 e p37 (revisto por D'ORSO,

DEGAUDENZI; FRASCH 2003). De modo geral, estas proteínas reconhecem sequências presentes nas regiões não traduzidas localizadas na extremidade 3' de mRNAs denominadas de 3'UTR.

Ensaio com gene repórter luciferase mostraram que sequência 3'UTR de diferentes genes estágios-específicos, como gp72, gp85 e gp82, podem alterar os níveis de expressão de luciferase. Por exemplo, as inserções de 3'UTR dos genes estágios-específicos gp72 e gp85 resultaram em diminuição dos níveis de transcritos em epimastigotas, promovendo a instabilidade ou maturação ineficiente do mRNA (NOZAKI; CROSS, 1995). Em mamíferos, a estabilidade de mRNAs é regulada por um elemento desestabilizador rico em AU na região 3'UTR, denominada ARE – *AU rich element* (CHEN; SHYU, 1995). Da mesma forma, elementos estáveis ricos em U – UREs, estrutural e funcionalmente relacionados aos AREs, foram encontrados na região 3'UTR de diferentes transcritos de *T. brucei*, que são estáveis na forma procíclica mas instáveis na forma sanguínea (revisto por CLAYTON e SHAPIRA, 2007), bem como em alguns mRNAs de *T. cruzi* (D'ORSO, DEGAUDENZI; FRASCH, 2003) e de *Leishmania* (revisto por HAILE; PAPADOPOULOU, 2007). Existem várias evidências para o papel de elementos presentes em moléculas de mRNA e de RBPs no controle da estabilidade e tradução de mRNA em tripanossomatídeos, contudo, pouco foi publicado até o momento quanto à maquinaria e mecanismos envolvidos com outros eventos pós-transcricionais, como por exemplo, a exportação de mRNA do núcleo para o citoplasma.



### 1.3. Exportação de mRNA em eucariotos: do núcleo celular ao citoplasma

Em células eucarióticas, a delimitação entre núcleo e citoplasma ocorre pela presença de uma dupla membrana lipídica que forma o envelope nuclear onde encontram-se proteínas denominadas nucleoporinas. Estas proteínas formam os complexos de poro nuclear (NPC) totalizando uma massa de aproximadamente 125 MDa, e podem ser compostos por até 100 proteínas diferentes (STOFFLER; FAHRENKOG; AEBI, 1999). A livre passagem é permitida a moléculas menores que 40 kDa, processo conhecido como difusão passiva, enquanto as macromoléculas atravessam com o auxílio de proteínas, caracterizando um processo seletivo com necessidade de sinais de transporte (YONEDA, 2000). Em *T. brucei* foram identificadas algumas nucleoporinas, como por exemplo, NUP1 que está envolvida com a organização de heterocromatina perinuclear, bem como proteínas possivelmente relacionadas ao transporte de macromoléculas através do NPC como TbGle2 e TbSec13 (ROUT; FIELD, 2001; DeGRASSE *et al.*, 2009).

A exportação de mRNA comumente auxilia no direcionamento para regiões de tradução, sendo um ponto de controle que garante o transporte dos transcritos corretamente processados e a síntese proteica em determinado local ou tempo dentro de uma célula ou organismo (DU; SCHIMD; JANSEN, 2007). O modelo geral de transporte núcleo-citoplasma de RNA tem a participação de proteínas da família das  $\beta$ -carioferinas (importinas e exportinas, responsáveis pela importação e exportação, respectivamente) que utilizam energia fornecida por Ran-GTP para o transporte de cargas (STRÖM; WEIS, 2001).

A importina-  $\beta$  em fungos, denominada Kap95, é um fator de transporte que interage com o adaptador Kap60 -importina- $\alpha$  - pelo reconhecimento de sinais de localização nuclear (NLS) presentes em proteínas que têm papel funcional no núcleo (POLLARD *et al.*, 1996). Outra representante da classe de importinas é a transportina 1 que reconhece a sequência denominada M9, que também está relacionada com a importação de macromoléculas para o núcleo (IZAURRALDE *et al.*, 1997).

As exportinas CAS e CRM1 de fungos, ortólogas funcionais de CSE e Exportin-1 (XPO1) de humanos respectivamente, são responsáveis principalmente pela exportação de proteínas e algumas espécies de RNAs. Geralmente, as exportinas interagem especificamente a algum tipo de RNA, apesar de ser

observado também que a mesma exportina pode transportar tipos diferentes de RNA. Em fungos, por exemplo, a exportação majoritária de tRNA e miRNA ocorre por exportinas diferentes: Los1 e Msn5, respectivamente, enquanto snRNA, snoRNA e rRNA são exportados pela mesma exportina: CRM1 (SHIBATA *et al.*, 2006; YAO *et al.*, 2007; KÖHLER; HURT, 2007).

As proteínas que possuem afinidade a CRM1 geralmente possuem sinal de exportação nuclear (NES) rico em leucina, motivo LRR, que foi primeiramente descrito pelo grupo de Takahashi (1985) que apresenta um consenso de aminoácidos com conservação na posição do aminoácido leucina: **LX<sub>1-3</sub>LX<sub>2-3</sub>LXL**, onde L é preferencialmente uma leucina e X um aminoácido qualquer (BOGERD *et al.*, 1996; IKUTA *et al.*, 1998). Este motivo LRR está ilustrado na figura 2.

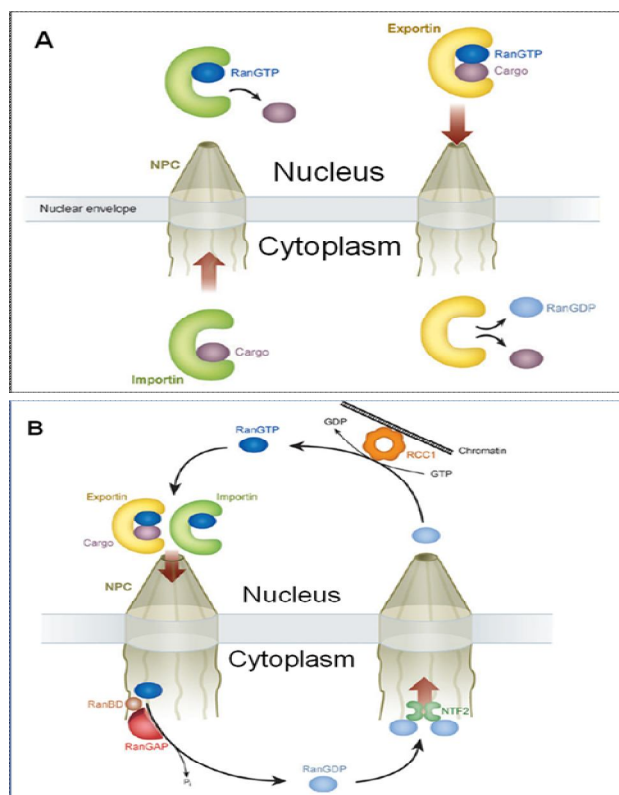
<b>MAPKK(32-43)</b>	A L Q K K L E E L E L D
<b>Rev(74-84)</b>	Q L - P P L E R L T L D
<b>Ahr(63-73)</b>	K L - D K L S V L R L S
<b>PKI(38-47)</b>	A L - - K L A G L D I N
<b>FMRP(428-437)</b>	Q L - - R L E R L Q I D

**Figura 2. Exemplos de proteínas que possuem domínio LRR.** A localização das leucinas permanece conservada em diferentes proteínas, destacadas em cinza. MAPKK: Map-quinase-quinase. Rev: proteína regulatória do vírus HIV. Ahr: fator  $\beta$  indutor de hipoxia. PKI: inibidor de proteína quinase A. FMRP: proteína encontrada na síndrome do X-frágil. G: Glicina. K: Lisina. P: Prolina. R: Arginina. Q: Glutamina. S: Serina. A: Alanina. V: valina. E: ácido glutâmico. D: Aspartato. N: Asparagina. T: Treonina. L: Leucina. I: Isoleucina. K: Lisina (FONTE: IKUTA *et al.*, 1998).

Os motivos LRR também são encontrados em proteínas de exportação de mRNA, posicionados na porção N-terminal, concomitantemente a outro domínio de reconhecimento de RNA – RRM - de aproximadamente 90 aminoácidos (DE GAUDENZI; D'ORSO; FRASCH, 2003; revisto por COOK *et al.*, 2007). Em *T. cruzi*, foi caracterizada uma proteína denominada TcUBP1 que possui este motivo consenso LRR e parece haver relação indireta com exportação de mRNAs (D'ORSO e FRASCH, 2001; CASSOLA e FRASCH, 2009). Neste mesmo grupo de pesquisadores, foi observado que o tratamento com leptomicina B (LMB), uma substância que inibe a função de CRM1, resulta em acúmulo de mRNAs de TcPABP1 e TcUBP2/1 no núcleo (CUEVAS; FRASCH; D'ORSO, 2005) e os autores propuseram que CRM1 estaria envolvida na exportação de mRNA. Esta substância se liga covalentemente a resíduos de cisteína desta proteína e interfere na interação

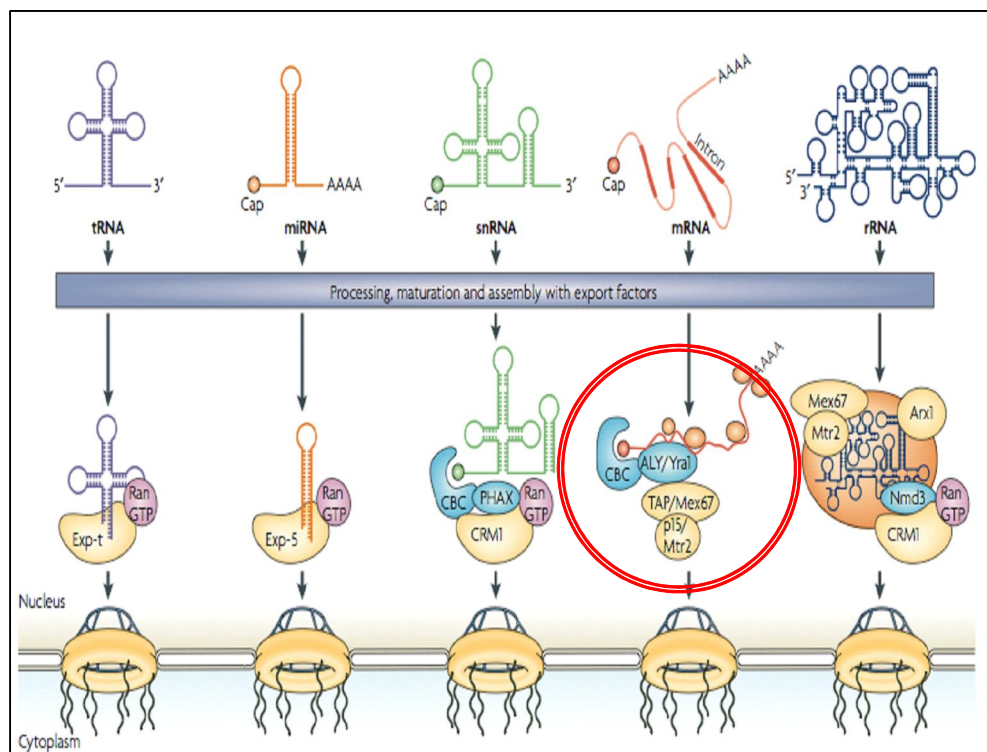
da molécula a ser exportada, comprometendo o processo de transporte (KUDO *et al.*, 1999). Apesar da presença das proteínas TcUBP1 e CRM1, não foi feita uma caracterização mais detalhada da maquinaria, assim como, não foi demonstrado que esta é a via exclusiva para a exportação de mRNA em *T. cruzi*.

Diferentes exportinas como CRM1, Los1 e Msn5 obedecem ao modelo geral de transporte de RNA dependente da proteína Ran (revisto por KÖHLER; HURT, 2007). A proteína Ran é uma GTPase pequena e solúvel, presente tanto no núcleo quanto no citoplasma de todas as células eucarióticas e tem um papel crítico na exportação de RNA: exportinas se ligam à carga junto com RanGTP no núcleo para formar o complexo ternário (RNA-exportina-RanGTP). Este complexo é então translocado para o citoplasma, onde se dissocia após hidrólise de GTP, ocorrendo a liberação do RNA. A proteína Rna1 de fungos (RanGAP em humanos) auxilia na hidrólise de GTP e liberação do RNA no citoplasma. O fator de transporte nuclear 2, NTF2, leva RanGDP para o núcleo, onde ocorre a mudança para RanGTP com auxílio da proteína Srm1 (RanGEF ou RCC1 em humanos) (TALCOTT; MOORE, 1999; STEWART, 2000; COOK *et al.*, 2007). O transporte de macromoléculas mediado pelo ciclo de Ran pode ser observado na figura 3.



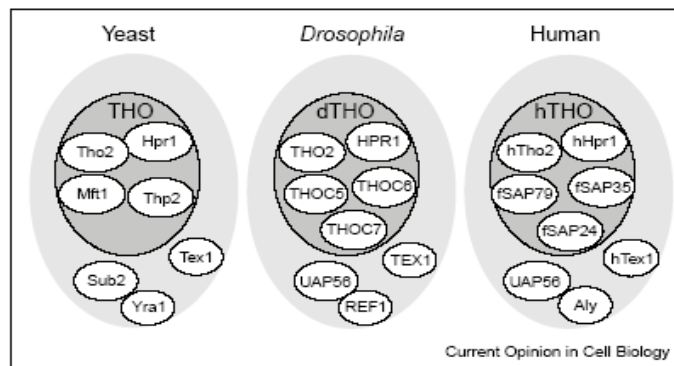
**Figura 3. Desenho esquemático do transporte de macromoléculas pelo ciclo de Ran em humanos.** A: Processos de exportação e importação mediados por  $\beta$ -carioferinas. Os dois complexos de poro nuclear (NPC) mostram características de cesta nuclear e fibrilas citoplasmáticas. A importina se liga à carga no citoplasma e a libera através de ligação a RanGTP no núcleo (esquerda). A exportina se liga à carga e a RanGTP no núcleo e libera a carga no citoplasma após hidrólise de RanGTP em RanGDP (direita). B: A alta concentração de RanGDP no citoplasma é mantida por RanGAP (*GTPase-activating protein*), que está ligada a fibrilas citoplasmáticas do NPC. A alta concentração de RanGTP no núcleo é mantida pelo regulador de condensação de cromossomo 1 (RCC1), um fator de ligação à cromatina de troca de guaninas (RanGEF) que age em RanGDP que é transportada para o núcleo através de NTF2 (FONTE: COOK *et al.*, 2007).

Estudos em *Drosophila melanogaster*, humanos e leveduras mostraram que CRM1 não é a via principal para a exportação de mRNA e que na realidade a via de exportação de mRNA é uma exceção para o modelo geral dependente de RanGTP e carioferinas (KATAHIRA *et al.*, 1999; HEROLD; TEIXEIRA; IZAURRALDE, 2003; SCHÜTZ *et al.*, 2006). Citando leveduras como exemplo, a exportação de mRNA é dependente de um dímero Mex67-Mtr2 (TAP-p15, em humanos) que é responsável por carrear o transcrito para o citoplasma com o auxílio de diversas proteínas adaptadoras (SEGREF *et al.*, 1997; THAKURTA *et al.*, 2002; KÖHLER e HURT 2007). Para simplificar, a figura 4 compara as vias de exportação de diferentes tipos de RNAs que dependem de RanGTP, e em destaque o transporte de mRNA não dependente de RanGTP.



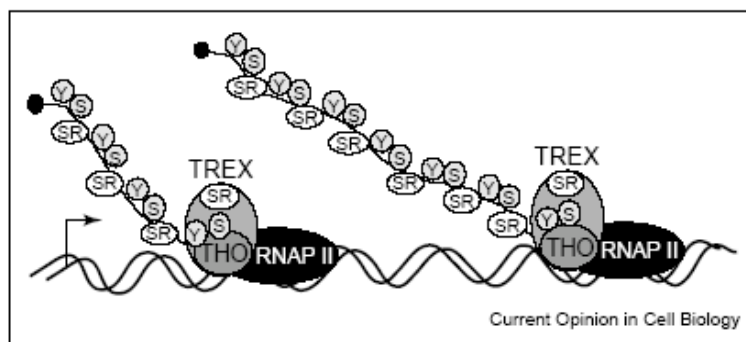
**Figura 4. Diferentes vias de exportação de RNAs em leveduras.** As vias majoritárias de transporte estão ilustradas: RNA transportador (tRNA), microRNA (miRNA), pequenos RNAs nucleares (snRNA), RNA mensageiro (mRNA) e RNA Ribossomal (rRNA). Em cada caso, o transcrito primário está ilustrado, bem como a proteína transportadora correspondente após processamento dos respectivos RNAs. Os adaptadores de exportação estão ilustrados em azul e receptores de exportação em amarelo. No caso de mRNA, ambos os nomes em humanos e fungos estão indicados, separados por “/”. Em humanos, os homólogos são: Aly, TAP e p15. Em fungos: Yra1, Mex67 e Mtr2, respectivamente. CBC, fator de ligação ao CAP; Exp, exportina. A via de mRNA está destacada em vermelho (ADAPTADO DE: KÖHLER; HURT, 2007).

Em fungos, durante a transcrição do mRNA existe a participação do complexo THO que interage com as proteínas Yra1, Tex1 e a RNA-helicase Sub<sub>2</sub>, originando o complexo TREX (*T*Ranscription/*E*Xport) cuja função está relacionada ao processo de transcrição e exportação de mRNA (JENSEN *et al.*, 2001; STRÄSSER *et al.*, 2002; REED; CHENG, 2005). O complexo THO é constituído pelas proteínas nucleares Tho2, Hpr1, Mft1 e Thp2 (CHAVEZ *et al.*, 2000) e é bastante conservado em fungos, *Drosophila* e humanos com proteínas homólogas presentes nos três organismos, como esquematizado na figura 5.



**Figura 5. Conservação do complexo TREX: Proteínas homólogas em diferentes organismos.** Complexos TREX de fungos, *Drosophila* e humanos contêm o complexo THO associado às proteínas de exportação (FONTE: REED; CHENG, 2005).

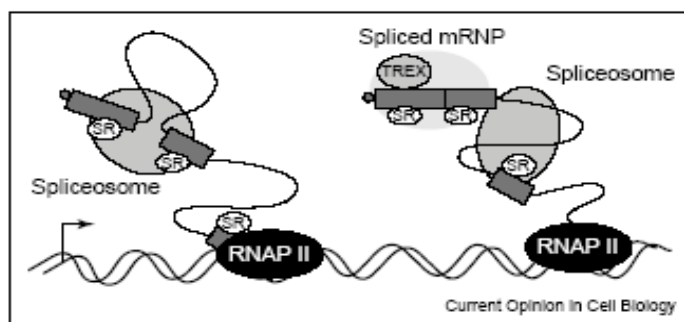
Em fungos, o complexo THO se associa primeiramente ao molde de DNA e as proteínas Yra1 e Sub2, formadoras do complexo TREX, são recrutadas cotranscricionalmente e interagem com o transcrito nascente (ABRUZZI; LACADIE; ROSBASH, 2004), como esquematizado na figura 6. Há também a participação de proteínas SR, ricas em domínios contendo serina (S) e arginina (R), que também são recrutadas durante a transcrição e podem interagir com RNA Polimerase II e complexo TREX (GRAVELEY, 2000; REED; CHENG, 2005).



**Figura 6. Recrutamento cotranscricional do complexo TREX em fungos.** Proteínas de exportação de mRNA Yra1p (Y) e Sub<sub>2</sub> (S). Proteínas tipo SR, Gbp2 e Hrb1, se associam ao complexo TREX. A seta indica a direção da transcrição (FONTE: REED; CHENG, 2005).

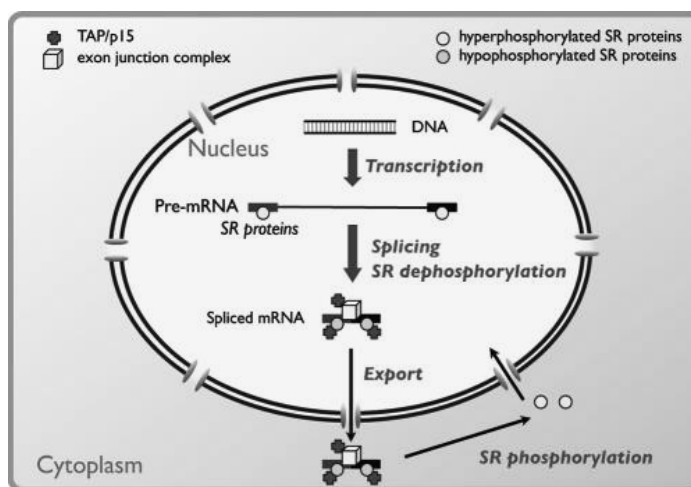
Estudos realizados em mamíferos indicam que o complexo TREX é recrutado durante o *splicing* do mRNA e proteínas deste complexo também foram caracterizadas como componentes do *spliceossomo*. A proteína Aly, por exemplo, se associa ao pré-mRNA ainda antes da formação do *spliceossomo*, enquanto Y14 e UAP56 se associam durante a formação deste (KATAOKA *et al.*, 2000; JURICA;

MOORE, 2003). O complexo TREX também se associa a proteínas do tipo SR, consideradas fatores de *splicing* que se ligam aos éxons do pré-mRNA e são responsáveis pelo recrutamento da maquinaria de processamento (HUANG; STEITZ, 2001). Um esquema da associação entre complexo TREX e “spliceossomo” em humanos pode ser observada na figura 7.



**Figura 7. Recrutamento em humanos do complexo TREX durante o *splicing*.** A montagem do “spliceossomo” e o “*splicing*” ocorre assim que o transcrito é sintetizado pela RNA polimerase II (RNAP II). SR-proteínas (SR) recrutam o spliceossomo e após o processamento permanecem ligadas ao mRNA havendo recrutamento do complexo TREX (FONTE: REED; CHENG, 2005).

Alguns exemplos de proteínas SR de fungos são Npl3 e Gbp2, e em humanos são 9G8 e ASF/SF2. Estas últimas migram do núcleo para o citoplasma após a ligação dos domínios SR à proteína TAP, receptora de exportação (CÁCERES; SCREATON, KRAINER, 1998; SANFORD; BRUZIK, 2001). Esta associação depende da fosforilação dos domínios SR: quando fosforilados, interagem com TAP e quando desfosforilados, além de ligarem à TAP, se ligam também ao mRNA. Provavelmente, a associação do complexo de exportação a fatores de *splicing* reflete um mecanismo que seleciona o mRNA corretamente processado em detrimento ao pré-mRNA (HUANG; YARIO; STEITZ, 2004). O modelo de exportação de mRNA com a participação de proteínas SR está ilustrado na figura 8.



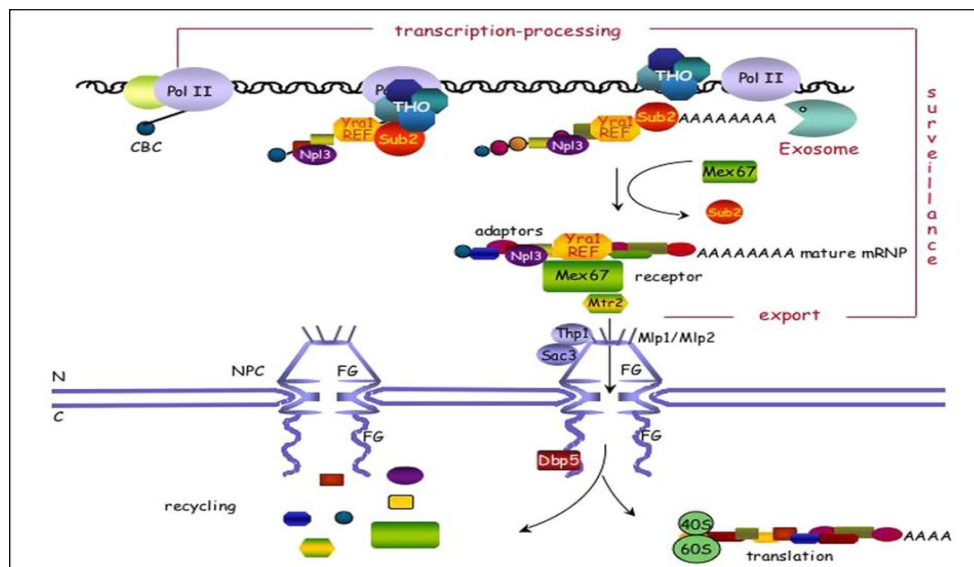
**Figura 8. Papel das proteínas SR na exportação de mRNA em humanos.** Proteínas SR hiperfosforiladas são recrutadas até moléculas de pré-mRNA, potencializando o *splicing*. Durante esse processamento proteínas SR são hipofosforiladas mas se mantêm associadas com o mRNA processado. A TAP é então recrutada, aumentando a eficiência de exportação em detrimento ao pré-mRNA não-processado. Após a exportação de mRNA para o citoplasma, há a refosforilação das proteínas SR que se dissociam dos complexos mRNPs e são então recicladas ao núcleo (FONTE: HUANG; YARIO; STEITZ, 2004).

Há também a participação de outro complexo que interage sinergicamente com TREX em relação à exportação de mRNAs denominado de TREX-2 ou THSC, formado pelas proteínas THP1-SAC3-SUS1-CDC31 que podem interagir também com o receptor de exportação Mex67-Mtr2. Este complexo está intimamente relacionado à transcrição devido à associação com outro conjunto de proteínas denominado SAGA, que tem como função a promoção de acetilação de histonas e interação com cromatina ativa (FISCHER *et al.*, 2002; TIMMERS; TORA, 2005; GONZÁLEZ-AGUILERA *et al.*, 2008). A proteína Sus1 é um componente central para a interação com proteínas do poro nuclear e há evidências de que em conjunto com a proteína Sac3 e Thp1 há o recrutamento da maquinaria de transcrição de mRNAs para próximo do NPC. Este processo de interação reforça a hipótese de "gene gating" que é a aproximação de genes ativos para a periferia do núcleo, facilitando o direcionamento do transcrito para o citoplasma (BLOBEL, 1985; FISCHER *et al.*, 2002; RODRÍGUEZ-NAVARRO *et al.*, 2004, revisto por IGLESIAS; STUTZ, 2008).

Por fim, a íntima interação entre transcrição, processamento e transporte de RNA reflete provavelmente o sinergismo entre os eventos nucleares e



citoplasmáticos no que diz respeito ao controle de qualidade do processamento do mRNA, assim como, a modulação da expressão gênica propriamente dita. A figura 9 ilustra o modelo de exportação de mRNA em fungos dentro do contexto dos eventos da expressão gênica.



**Figura 9. Exportação de mRNA é acoplado à transcrição e processamento em fungos.** O complexo THO está associado à maquinaria de transcrição durante a elongação facilitando o recrutamento dos adaptadores de exportação de mRNA, Sub<sub>2</sub> e Yra1, aos transcritos nascentes, que recrutam o receptor de exportação, Mex67. Defosforilação de proteínas SR, Npl3p (outro adaptador para Mex67) é também necessária para a liberação do mRNA da maquinaria de processamento, havendo recrutamento de Mex67 ao transcrito poliadenilado. Mex67 medeia a translocação de mRNP pela interação com FG-nucleoporinas de complexo de poro nuclear. A proteína Dbp<sub>5</sub>, recruta mRNP e interage na face citoplasmática do poro nuclear, permitindo liberação do mRNA no citoplasma pelo complexo de exportação (FONTE: RODRIGUEZ; DARGEMONT; STUTZ, 2004).

A diferença entre os componentes envolvidos nesses processos possivelmente reflete características específicas no metabolismo de RNA de cada organismo. Por exemplo, em leveduras o processamento de mRNA por *cis-splicing* ocorre apenas para a minoria dos genes, enquanto em metazoários o *cis-splicing* passa a ser regra. No grupo de organismos basais as peculiaridades são evidentes, como é o caso dos tripanossomatídeos, onde um RNA policistrônico é processado por *trans-splicing*, com semelhanças e diferenças quando comparado ao processamento por *cis-splicing*. Sendo assim, a caracterização de eventos pós-transcricionais, como no caso da exportação de mRNA em tripanossomatídeos, é sem dúvida relevante para enriquecer o que se sabe sobre a biologia molecular destes parasitas.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Utilizar ferramentas de bioinformática, genética reversa, biologia molecular e celular para identificar proteínas de *T. cruzi* envolvidas na exportação de mRNA do núcleo para o citoplasma.

### 2.2. Objetivos específicos

**Objetivo 1-** Identificar as proteínas envolvidas na exportação de RNA em organismos basais, entre eles *T. cruzi*, por análises de genômica comparativa.

Meta 1.1 – Buscar na literatura as proteínas de vias de exportação do núcleo para o citoplasma de diferentes tipos de RNAs, entre eles mRNAs, com evidências funcionais em *S. cerevisiae* e *H. sapiens* (organismos-modelo) cujas vias estão bem caracterizadas.

Meta 1.2 – Executar análises comparativas de estruturas primárias das proteínas encontradas através de alinhamentos com espécies de eucariotos superiores e basais, a fim de cobrir a árvore filogenética dos eucariotos.

**Objetivo 2-** Analisar domínios funcionais de TcSub2 através de modelagem molecular por homologia estrutural.

**Objetivo 3** – Localização celular de TcSub2 em *T. cruzi*.

Meta 3.1 – Expressar e purificar proteínas recombinantes em *Escherichia coli* e obter antisoro policlonal através de inoculação destas proteínas em coelhos e camundongos.

Meta 3.2 - Expressar a proteína TcSub2 fusionada a GFP - *green fluorescent protein* - em *T. cruzi* para localização celular por microscopia óptica de fluorescência.

Meta 3.3 – Localizar em *T. cruzi* as proteínas através de ensaios de microscopia ótica e eletrônica de transmissão por imunofluorescência e imunocitoquímica, respectivamente.

**Objetivo 4** – Caracterizar funcionalmente a proteína TcSub2 por abordagens de genética reversa.

Meta 4.1 – Avaliar a viabilidade de manipulação por nocaute gênico em *T. cruzi*.

Meta 4.2 – Analisar o fenótipo causado pelo silenciamento, por interferência de RNA (RNAi), de genes de *T. brucei* ortólogos aos genes identificados em *T. cruzi*.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Identificação de proteínas e análises de genômica comparativa**

##### **3.1.1. Identificação de proteínas componentes da via de exportação de diferentes tipos de RNA através de evidências experimentais na literatura**

Muitos mecanismos de exportação de mRNA têm sido estudados em leveduras (*S. cerevisiae*) e humanos (*H. sapiens*) e pouco se sabe a respeito deste tipo de transporte em tripanossomatídeos, entre eles *T. cruzi*. Por esse motivo, foi feito uma busca na literatura nestes organismos-modelo para a identificação de proteínas envolvidas em transporte de diferentes tipos de RNAs , entre eles mRNA.

Para esta análise, primeiramente foram identificadas proteínas de *S. cerevisiae* funcionalmente caracterizadas na literatura e a partir destas foram verificadas quais apresentam caracterização funcional em humanos na literatura, bem como estão indicadas como ortólogas pelo banco de dados do Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>). A partir desses resultados foi feita uma tabela (tabela 3) indicando os IDs do Genbank das proteínas de *S. cerevisiae* e humanos que foram utilizadas como sementes de busca (*queries*). Como as proteínas de humanos foram pesquisadas a partir de dados funcionais relacionados a *S. cerevisiae* e necessariamente precisam estar indicadas pelo Ensembl, houve menor número de proteínas listadas.

##### **3.1.2. Análises comparativas por alinhamento de proteínas através de BLASTP**

As sequências das proteínas de *S. cerevisiae* e *H. sapiens* identificadas conforme item 3.1.1 foram utilizadas como *queries* para análises de conservação de estrutura primária através de alinhamento local – BLASTP (ALTSCHUL *et al.*, 1997)

– em bancos de proteínas de eucariotos superiores e basais. São considerados eucariotos basais aqueles que divergiram cedo ao longo da evolução - *deeply diverging lineages* – como por exemplo as linhagens eucarióticas Chromalveolates e Excavates, sendo este último o supergrupo onde *T. cruzi* está inserido. As sequências encontradas nos diferentes bancos de dados através das *queries* são denominadas de *subjects* e as regiões de maior pontuação para o alinhamento local são denominadas HSPs.

Os bancos de proteínas utilizados para os alinhamentos foram de representantes dos supergrupos de eucariotos Animalia, Fungi, Chromalveolata, Amoebozoa, Plantae e Excavates cobrindo a árvore filogenética dos eucariotos, o que permitiu inferir a conservação de cada *query* ao longo da evolução. Foram inicialmente analisadas 45 espécies destes supergrupos e foi considerado como resultado final o melhor *hit* encontrado em cada espécie.

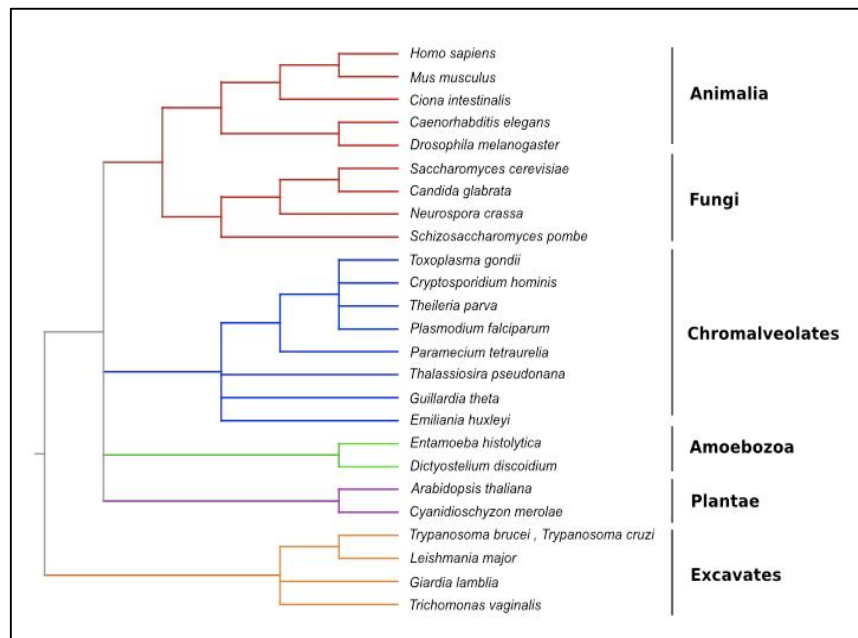
Esta análise inicial incluiu duas ou mais espécies representativas dos gêneros *Caenorhabditis*, *Cryptosporidium*, *Leishmania*, *Plasmodium* e *Trypanosoma* que proveram redundância e serviram como controles consistentes para o protocolo de análise que foi realizado. As 45 espécies com as respectivas informações dos bancos de proteínas e o resultado inicial estão anexados (Anexo 1 - mídia).

Posteriormente, estes resultados foram simplificados para 25 espécies (mostradas na TABELA 1) cobrindo a filogenia de eucariotos, como pode ser observada na figura 10. Para estas 25 espécies foi realizada uma análise mais criteriosa onde os casos que apresentaram mais de um HSP por alinhamento para o mesmo *subject*, tiveram os múltiplos HSPs somados e utilizados para a aquisição real da cobertura de cada alinhamento.

**TABELA 1. ESPÉCIES UTILIZADAS PARA ANÁLISES DE CONSERVAÇÃO DE PROTEÍNAS.** À esquerda, a abreviação relacionada a cada espécie e à direita, o supergrupo correspondente.

Abreviação	Espécies	Supergrupo eucariótico
Hsa	<i>Homo sapiens</i>	Animalia
Mmu	<i>Mus musculus</i>	Animalia
Cin	<i>Ciona intestinalis</i>	Animalia
Cel	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Animalia
Dme	<i>Drosophila melanogaster</i>	Animalia
Sce	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Fungi
Cgl	<i>Candida glabrata</i>	Fungi
Ncr	<i>Neurospora crassa</i>	Fungi
Spo	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Fungi
Tgo	<i>Toxoplasma gondii</i>	Chromalveolate
Cho	<i>Cryptosporidium hominis</i>	Chromalveolate
Tpa	<i>Theileria parva</i>	Chromalveolate
Pfa	<i>Plasmodium falciparum</i>	Chromalveolate
Pte	<i>Paramecium tetraurelia</i>	Chromalveolate
Tps	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	Chromalveolate
Gth	<i>Guillardia theta</i>	Chromalveolate
Ehu	<i>Emiliana huxleyi</i>	Chromalveolate
Ehi	<i>Entamoeba histolytica</i>	Amoebozoa
Ddi	<i>Dictyostelium discoideum</i>	Amoebozoa
Ath	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Plantae
Cme	<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	Plantae
Tbr	<i>Trypanosoma brucei</i>	Excavate
Tcr	<i>Trypanosoma cruzi</i>	Excavate
Lma	<i>Leishmania major</i>	Excavate
Gla	<i>Giardia lamblia</i>	Excavate
Tva	<i>Trichomonas vaginalis</i>	Excavate

Foram utilizadas 25 espécies para as análises. Nesta tabela também está inserida *S. cerevisiae*, apenas para ilustrar a abreviação utilizada para esta espécie



**Figura 10. Árvore filogenética de eucariotos utilizados neste estudo.** A figura foi obtida pelo programa Treeview (PAGE, 1996). As espécies pertencentes ao mesmo supergrupo de eucariotos foram agrupadas por cores. (FONTE: Adaptação de Collins e Penny, 2005).

A classificação da conservação de estrutura primária das proteínas ao longo da filogenia de eucariotos foi realizada através de números de 1 a 5 em escala decrescente de conservação, sendo os números 1 e 2 considerados os resultados de proteínas altamente conservadas. Para as análises, foi primeiramente determinada a linha de corte de *e-value* de E-03 e os resultados com *e-value* maiores foram classificados como (NH), indicando que não houve *hits* para a análise. Foram analisados somente os *hits* que apresentaram o *e-value* menor que E-05 e aqueles que apresentaram valores entre E-03 e E-05 foram denominados de (SC), indicando que não houve a classificação por números.

Um dos critérios utilizados para as análises foi a porcentagem de similaridade entre *query* e *subject*. A similaridade indica o grau de semelhança entre as sequências em um alinhamento, revelando a porcentagem de aminoácidos que apresentam características bioquímicas similares em ambas as proteínas. Foi analisada a cobertura da *query* no resultado do BLASTP (HSP/CQ), onde HSP é o comprimento da região alinhada entre *query* e *subject* e CQ é o comprimento da *query*. Um critério para analisar se essa cobertura de alinhamento foi ao longo de

toda a *query* ou apenas em regiões específicas desta, como domínios por exemplo, foi utilizado o critério de similaridades de comprimentos entre *query* e *subject* (CQ ~ CS) onde CS indica comprimento do *subject*. Para este critério de comprimento foi padronizado que CQ ~ CS podia diferir em até no máximo 30% e neste caso, uma alta cobertura de alinhamento (HSP/CQ maior ou igual a 60%) indicou regiões conservadas maiores entre as proteínas analisadas. Quando estes critérios foram levados em consideração, bem como uma alta similaridade entre as proteínas (maior ou igual a 60%), resultou em melhor classificação como 1 e 2, por exemplo.

Para os resultados em que os comprimentos das sequências CQ e CS diferiram em mais de 30%, foram observados alinhamentos parciais havendo pior classificação de conservação. Os critérios de classificação das proteínas em números de 1 a 5 estão sumarizados na tabela 2.

**TABELA 2. CRITÉRIOS UTILIZADOS PARA A CLASSIFICAÇÃO DOS RESULTADOS DE ALINHAMENTOS DE PROTEÍNAS POR BLASTP.** Os números indicam a classificação: 1 - altamente similar; 2 – similar; 3 - pouco similar; 4 e 5 – parcialmente similar. As classificações 1 e 2 estão em destaque para ilustrar os melhores resultados de conservação neste tipo de análise.

Classificação	Crítérios
<b>1</b>	Similaridade $\geq 60\%$ e HSP/CQ $\geq 0.80$ e CQ ~ CS
<b>2</b>	Similaridade $\geq 50\%$ e HSP/CQ $\geq 0.60$ e CQ ~ CS
3	Similaridade $\geq 40\%$ e HSP/CQ $\geq 0.45$ e CQ ~ CS
4	Similaridade $\geq 30\%$ e HSP/CQ $\geq 0.30$
5	Similaridade $\leq 30\%$ ou HSP/CQ $\leq 0.30$
SC	$1E-5 \leq \text{E-value} \leq 1E-3$
NH	E-value $> 1E-3$

### 3.1.3. Análise comparativa utilizando-se dados de sintenia genômica presentes no TritrypDB

A verificação de sintenia genômica em tripanossomatídeos foi realizada pela utilização dos resultados contidos em banco de dados do TritrypDB (<http://TriTrypDB.org>) (AURRECOECHEA *et al.*, 2007).



### 3.2. Predição estrutural de proteínas utilizando-se o programa de bancos de dados de estruturas tridimensionais PDB e MODELLER

Foram realizadas buscas por proteínas homólogas utilizando as estruturas primárias com o auxílio do programa BLASTP (ALTSCHUL *et al.*, 1997) e o banco de estruturas tridimensionais depositadas no banco de dados de proteínas PDB (WESTBROOK *et al.*, 2002). Alinhamentos baseados em estruturas secundárias entre proteínas que apresentaram menor identidade sequencial foram realizados através do programa GenTHREADER (McGUFFIN; JONES, 2003).

Modelos moleculares foram constituídos para os alvos identificados com o emprego da técnica baseada em restrições espaciais implementadas pelo programa MODELLER 9v3 (SALI; BLUNDELL, 1993). Foram utilizados critérios para aumentar o grau de liberdade, facilitar a modelagem de regiões de laços e voltas bem como refinar a predição e a análise comparativa.

### 3.3. Soluções e tampões

**AP Buffer (tampão de reação para fosfatase alcalina):** Tris-HCl 100 mM pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM.

**Fenol - clorofórmio - álcool isoamílico:** Fenol saturado 25 partes, clorofórmio 24 partes, álcool isoamílico 1 parte, Tris-HCl 100 mM pH 8,0 10 partes.

**Solução de bloqueio para *Western blot*:** Tampão PBS, Tween 20 0,05% e leite em pó desnatado 5%.

**Solução de Brometo de Etídio:** 5,0 µg/mL de brometo de etídio em água destilada.

**Solução de descoloração de proteínas:** Metanol 30%, ácido acético 10%, água 60%.

**Solução de hibridação para *Southern blot*:** SSC 6x, solução Denhardt 5x, SDS 0,1%, DNA fita simples de esperma de salmão 100 µg/mL.

**Solução de lise para método de palitagem:** NaOH 50 mM, glicerol 5%, SDS 0,5%, EDTA 5 mM, azul de bromofenol 0,025% em água deionizada.

**Solução de lise para eletroforese em campo de pulsos alternados:** EDTA 0,5 M pH 9,0; Sarcosyl 1%, Proteinase K 0,5 mg/mL.

**Solução de Ponceau S:** Ponceau S (Sigma P-3504) 0,5%, Ácido acético glacial 1%.

**Solução para coloração de géis de proteínas SDS-PAGE:** Azul de comassie R-250 0,1% em metanol/ácido acético v/v (45%:10%); água 45%.

**Solução PSA 2%:** Fosfato de sódio 75 mM pH 8,0; NaCl 65 mM; Agarose *Low Melting* 2%.

**Solução PSG:** Fosfato de sódio 75 mM pH 8,0; NaCl 65 mM, Glicose 1,5%.

**Solução TBE para eletroforese de DNA (Tris- Ácido Bórico – EDTA):** Tris-base 89 mM, Ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM pH 8.0.

**Solução TE (Tris-EDTA):** Tris-HCl 10 mM pH 7.5; EDTA 1 mM.

**Tampão de amostra para eletroforese de DNA 6x:** Azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol 0,25%, glicerol 30%.

**Tampão de amostra de proteínas:** Tris-HCl 40 mM pH 6,8; SDS 1%,  $\beta$ -mercaptoetanol 2,5%, glicerol 6% e azul de bromofenol 0,005%.

**Tampão de eletroporação de *T. cruzi*:** NaCl 140 mM, HEPES ácido 25 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,74 mM.

**Tampão de lavagem para incorporação de BrUTP:** Sacarose 150 mM, glutamato de potássio 20 mM,  $\text{MgCl}_2$  3 mM, DTT 2 mM, leupeptina 10  $\mu\text{g/mL}$ .

**Tampão de marcação para incorporação de BrUTP:** tampão de lavagem adicionado de creatina fosfato 50 mM, creatina cinase 200  $\mu\text{g/mL}$ , RNasin (Promega) 120 U/mL e, quando indicado,  $\alpha$ -amanitina 200  $\mu\text{g/mL}$ .

**Tampões de lavagem e eluição de proteínas recombinantes em coluna Ni-NTA (Qiagen):**

- Tampão A: GuHCl 6 M;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,1 M; Tris-Cl 0,01 M pH 8.0.
- Tampão B: uréia 7 M;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,1 M; Tris-Cl 0,1 M pH 8.0.
- Tampão C: uréia 8 M;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,1 M; Tris-Cl 0,1 M pH 6.3.
- Tampão D: uréia 8 M;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,1 M; Tris-Cl 0,1 M pH 5.9.
- Tampão E: uréia 8 M;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,1 M; Tris-Cl 0,1 M pH 4.5.
- Tampão F: uréia 8 M;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,1 M; Tris-Cl 0,1 M pH 4.0.
- Tampão G: uréia 8 M;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,1 M; Tris-Cl 0,1 M pH 3.5.
- Tampão H: uréia 8 M;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,1 M; Tris-Cl 0,1 M pH 3.0.

**Tampão de Lise Hipotônica:** Tris-HCl 10 mM pH 7,5;  $\text{MgCl}_2$  10mM, NaCl 10 mM.

**Tampão de purificação de proteínas:** TRITON X-100 2%,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  100 mM, NaCl 0,5 M, Tris - HCl pH 8,0 10 mM, Uréia 2 M.

**Tampão de sonicação de proteínas:** NaCl 500 mM, TRITON X-100 2%, Tris-HCl 20 mM pH 8,0.

**Tampão de suspensão de proteínas:** NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM, Tris-HCl 10 mM, Uréia 8 M pH 8,0.

**Tampão de transferência para *Western blot*:** Tris-base 25 mM, Glicina 192 mM, Metanol 20%.

**Tampão de corrida para SDS-PAGE:** Tris-HCl 0,037 M pH 8,4; Glicina 192 mM pH 8,4; SDS 0,1%.

**Tampão PBS - TWEEN 20:** PBS -Tween 20 0,05%.

**Tampão PBS - solução de uso (*Phosphate-buffer saline*):** KCl 2,7 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM, NaHPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 4,3 mM; NaCl 137 mM.

**Tampão SSC 20X:** NaCl 3M e Citrato trisódico 2-hidrato 0,3M.

**Tampão ZPFM de eletroporação de *T. brucei*:** NaCl 129mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5mM, KCl 8mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 8mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5mM, CaCl<sub>2</sub> 90 µM e CH<sub>3</sub>COONa 2,4 mM pH 7,0.

### 3.4. Microrganismos

#### 3.4.1. *Escherichia coli*

Genótipo BL21(DE3): {pLysS<sup>TM</sup> {F<sup>-</sup> *ompT hsdSB* (*r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>*) *gal dcm* (DE3) pLysS (Cm<sup>R</sup>)}.

Genótipo DH5α<sup>TM</sup>: {F- *recA1 endA1 hsdR17* (*r<sub>K</sub><sup>-</sup> mk<sup>+</sup>*) *supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1*}.

#### 3.4.2. *T. cruzi* clone Dm28c (GOLDENBERG *et al.*, 1984)

Formas epimastigotas foram mantidas em cultura axênica de meio LIT (CAMARGO, 1964) a 28 °C com passagens a cada quatro dias.

Formas tripomastigotas metacíclicas foram obtidas após a metaciclogênese *in vitro*, segundo Contreras e colaboradores (1985) com modificações, conforme descrito no item 3.6.

### 3.4.3. *Trypanosoma brucei* cepa 29-13 (WIRTZ *et al.*, 1998)

Foram utilizadas as formas procíclicas que expressam o repressor de tetraciclina e a T7 RNA polimerase para utilização em ensaios de genética reversa. Os parasitas foram mantidos em cultura axênica de meio SDM-79 complementado com 10% de Soro Bovino Fetal (BRUN; SCHONONBERGER 1979) e antibióticos apropriados.

## 3.5. Meios de cultura

<b>Meio LB (Luria-Bertani)</b>	<b>g/l</b>
Bacto-triptona.....	10,0
NaCl.....	5,0
Extrato de levedura.....	5,0
(LB-ágar): adição de 1,5% de agar-ágar.	
<b>Meio LIT (CAMARGO, 1964)</b>	<b>l</b>
Infusão de fígado .....	5,0 g
NaCl.....	4,4 g
KCl.....	0,4 g
Glicose.....	2,2 g
Triptose.....	5,0 g
Fosfato básico de sódio.....	11,56 g
Extrato de levedura.....	15,0 g
Hemina.....	0,02 g
Soro fetal bovino.....	10%
Penicilina.....	10.000 U
pH 7,2	
<b>Meio SDM-79</b>	<b>1 l</b>
MEM (Minimum Essential Medium).....	7,0 g

Meio 199.....	2,0 g
MOPS.....	5,0 g
HEPES.....	8,0 g
Glicose.....	1,0 g
NaHCO <sub>3</sub> .....	2,0 g
Piruvato de Sódio .....	0,1 g
L-Alanina.....	0,2 g
L-Arginina.....	0,1 g
L-Glutamina.....	0,3 g
L-Metionina.....	0,07 g
L-Fenilalanina.....	0,08 g
L-Prolina.....	0,6 g
L-Serina.....	0,06 g
Taurina.....	0,18 g
L-Treonina.....	0,35 g
Adenosina.....	0,1g
Guanosina.....	0,01 g
Glucosamina.....	0,05 g
MEM amino acids solution, 50X.....	10 mL
MEM non essential amino acids 100X .....	6 mL
Penicilina.....	0,059 g
Streptomicina.....	0,133 g
Ácido Fólico.....	0,004 g
PABA (ácido Para-aminobenzóico).....	0,002 g
Biotina.....	0,0002 g

**Meio TAU (Triatomine Artificial Urine)****mM**

NaCl.....	190,0
KCl.....	17,0
CaCl <sub>2</sub> .....	2,0
MgCl <sub>2</sub> .....	2,0
Tampão fosfato pH 6,0.....	8,0

**Meio TAU 3AAG     pH 6,0****mM**

Meio TAU suplementado com:

Glicose.....	10,0
Ácido L-aspartico.....	2,0
Ácido L-glutâmico.....	50,0
L-Prolina.....	10,0

### 3.6. Metaciclogênese *in vitro*

O processo de diferenciação de formas epimastigotas para tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi* ocorre naturalmente no intestino do inseto vetor e pode ser mimetizado *in vitro* em condições quimicamente definidas permitindo isolar células em vários estágios de diferenciação deste parasita (CONTRERAS *et al.*, 1985b; BONALDO *et al.*, 1988)

Para a obtenção das formas tripomastigotas metacíclicas, formas epimastigotas em final de fase exponencial de crescimento foram centrifugadas a  $7.000 \times g$  por 5 minutos a  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ . As células foram suspensas em meio TAU com densidade de  $5,0 \times 10^8$  células/mL e incubadas a  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 2 horas (CONTRERAS *et al.*, 1985b). Após esse período de estresse nutricional, os parasitas foram inoculados na concentração final de  $5,0 \times 10^6$  células/mL em meio TAU3AAG e incubados a  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  sem agitação durante 96 horas. Neste sistema os parasitas aderem-se às paredes das garrafas de cultivo e se diferenciaram nas formas tripomastigotas metacíclicas, soltando-se do “substrato”. Para obtenção das células aderidas após 12 e 24 horas, o sobrenadante da cultura foi desprezado e as formas aderidas foram liberadas por forte agitação das garrafas de cultura com tampão NKM (BONALDO *et al.*, 1988). Para a obtenção de formas metacíclicas purificadas, foi coletado o sobrenadante da cultura e em seguida realizada cromatografia de troca iônica com resina de DEAE celulose (DEAE-52 Whatman) (CONTRERAS *et al.*, 1985b). Para a obtenção dos extratos protéicos dos parasitas obtidos em diferentes pontos da metaciclogênese, estes foram lavados com PBS adicionado de inibidores de protease e suspensos em tampão de amostra para proteínas, seguido de fervura a  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 3 minutos. O extrato protéico de amastigotas já estava previamente preparado e estocado no laboratório.

### 3.7. Obtenção de DNA genômico de *T. cruzi* Dm28c (FRAGOSO e GOLDENBERG, 1992)

Um total de  $5 \times 10^{10}$  parasitas foram coletados do meio LIT por centrifugação a  $7.000 \times g$  por 10 minutos. As células foram lavadas em PBS, suspensas em 20 mL de tampão de lise hipotônica e lisadas pela adição de Nonidet P-40 de concentração final de 1% por 3 minutos a 4 °C. A fração contendo os núcleos celulares foi enriquecida após três ciclos de centrifugação a  $800 \times g$  por 10 minutos a 4 °C. Esta fração foi digerida com proteinase K 100 µg/mL por 12 horas a 37 °C em 5 mL de solução contendo NaCl 10 mM, EDTA 5 mM, SDS 0,5% e Tris-HCl 10 mM pH 7,6. O DNA foi purificado com fenol saturado em Tris-base 100 mM e dialisado três vezes com 20 mL de solução contendo NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7,6.

### 3.8. Preparação de bactérias cálcio-competentes

Para o preparo de bactérias cálcio-competentes, foi utilizado o método de  $\text{CaCl}_2$  descrito em Sambrook e colaboradores (2001). Uma colônia de *E. coli* da cepa desejada foi inoculada em 5,0 mL de meio LB contendo antibiótico apropriado [50 µg/mL de canamicina, no caso de *E. coli* Bl21 (DE3)]. A cultura foi incubada a 37 °C por 18 horas sob agitação constante de 220 rpm. Um volume de 1 mL desta cultura foi transferido para 100 mL de meio LB. As células foram incubadas a 37 °C sob as mesmas condições de agitação até alcançar a fase de crescimento exponencial (D.O.<sub>600</sub> de 0,6).

A cultura foi centrifugada a  $4.000 \times g$  por 5 minutos a 4 °C e as células foram suspensas em 50 mL (metade do volume original) de solução gelada de  $\text{CaCl}_2$  100 mM tamponada com HEPES 10 mM pH 7,0 e mantidas no gelo durante 30 minutos. A suspensão foi submetida à centrifugação nas mesmas condições anteriores, as células foram suspensas em 2,0 mL (1/50 do volume da cultura original) da solução

anterior acrescida de 10% de glicerol, mantidas no gelo seco por 2 horas e em seguida aliquotadas e armazenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### 3.9. Transformação de bactérias cálcio-competentes

Reações de recombinação ou ligação foram incubadas com 100  $\mu\text{L}$  da suspensão de *E. coli* cálcio-competentes por 30 minutos no gelo. Após esse período, as células foram submetidas ao choque térmico pela incubação a  $42^{\circ}\text{C}$  por 2 minutos, seguido de incubação de 2 minutos no gelo e posterior adição de 1 mL de meio LB para incubação sob agitação constante de 220 rpm a  $37^{\circ}\text{C}$  por uma hora. Aliquotas de 100  $\mu\text{L}$  e 900  $\mu\text{L}$  foram espalhadas em meio LB-ágar adicionado de antibiótico (meio seletivo) de acordo com a resistência conferida pelo vetor utilizado na transformação de bactérias e incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 18 horas. As colônias crescidas nessas condições foram analisadas por PCR de colônia ou pelo método de palitagem, conforme descrito nos itens a seguir.

No caso de clonagem em pGEM, o meio LB-ágar foi adicionado de 100  $\mu\text{g/mL}$  de ampicilina, 0,04 mg/mL de X-gal e 0,4 mM de IPTG. Neste caso, a seleção dos clones positivos foi feita pela análise da cor das colônias, devido a presença ou ausência da expressão da enzima  $\beta$ -galactosidase. Esta, cuja expressão é induzida por IPTG, degrada o substrato X-gal produzindo um substrato azul. Caso o fragmento seja incorporado ao vetor, a enzima  $\beta$ -galactosidase não é expressa e as colônias permanecem brancas, facilitando a identificação dos clones positivos, que posteriormente foram sequenciados.

### 3.10. PCR de colônia

Após o crescimento em meio seletivo, cada colônia foi coletada e misturada em 10  $\mu\text{L}$  de água deionizada, sendo utilizado 1  $\mu\text{L}$  dessa suspensão para cada reação de PCR. Foram acrescentados aos tubos de PCR os reagentes e os oligonucleotídeos iniciadores que anelam com regiões que flanqueiam o fragmento



de DNA a ser amplificado, em um volume final de reação de 20  $\mu$ L. As amostras foram incubadas inicialmente com um *holding* de 94 °C por 10 minutos seguidos de 35 ciclos de amplificação. As temperaturas, tempo de anelamento e extensão foram padronizados para cada caso devido às características dos iniciadores e tamanho do fragmento amplificado.

### **3.11. Verificação de clonagem pelo método de palitagem (*Toothpick*)**

Após a seleção por antibiótico apropriado, cada colônia foi removida com um palito esterilizado e transferida para um tubo de 1,5 mL. Em cada tubo foi adicionado 15  $\mu$ L de solução de lise e a mistura foi incubada a 65 °C por 10 minutos. O lisado foi centrifugado a 13.000 x *g* por 1 minuto e aplicado em gel de agarose 0,8 % não submerso em tampão TBE e submetido à diferença de potencial de 80 V. Uma vez que as amostras entraram na malha do gel de agarose, o volume de tampão TBE foi completado e a voltagem alterada para 100 V. O gel foi corado através da imersão em solução de brometo de etídeo e analisado em luz ultravioleta (UV).

### **3.12. Transfecção e seleção de parasitas**

#### **3.12.1. Transfecção de *T. cruzi* por eletroporação e seleção dos transfectantes**

Para cada transfecção, um total de  $1 \times 10^8$  formas epimastigotas em fase logarítmica de crescimento foram coletadas por centrifugação por 5 minutos a 7.000 x *g*, lavadas com PBS estéril e suspensas em 1 mL de tampão de eletroporação. Em seguida foram coletados 0,4 mL desta suspensão (referente a  $4 \times 10^7$  células) e transferidos para cubeta de eletroporação de 0,2 mm pré-resfriada. Foi adicionado o DNA às células e a mistura foi incubada por 10 minutos no gelo. Para a transfecção do plasmídeo pTcPR-GFPN-TcSub2 foram utilizados 50  $\mu$ g de DNA e para

transfecção através de fragmento de DNA para o nocaute do gene TcSub2, foram utilizados 10 µg de DNA. Para controle da seleção, formas epimastigotas foram eletroporadas sem a presença de DNA.

A mistura foi submetida à eletroporação com 2 pulsos de 450 V e 500 µF em eletroporador GenePulser® II Apparatus (Bio-Rad) e mantida por 10 minutos no gelo. Em seguida, as células foram transferidas para garrafas de cultura de 25 cm<sup>3</sup> contendo 10 mL de meio LIT adicionado de penicilina e incubadas a 28 °C durante 24 horas. Após este período de recuperação, o processo de seleção dos parasitas foi feito pela adição em meio LIT de 500 µg/mL de G418 e/ou higromicina, dependendo do experimento. Aproximadamente 72 horas após a adição das drogas foi feita uma diluição 1:4 dos parasitas em meio contendo 500 µg/mL de G418 e/ou higromicina.

As culturas foram cultivadas com passagens regulares até que fosse observada a inibição total do crescimento celular na cultura controle, que foi eletroporada sem DNA. As células resistentes à droga foram selecionadas em intervalo de 10 a 30 dias. A clonagem dos parasitas mutantes foi realizada através de diluição limitante em meio LIT adicionado de 500 µg/mL de G418 e/ou higromicina, dependendo do experimento. Após a seleção, foi realizada a curva de crescimento das culturas dos transfectantes através de contagem em câmara de Neubauer para comparação de crescimento com parasitas selvagens (*Wild-type* - WT), bem como a observação de possíveis alterações morfológicas.

### **3.12.2. Transfecção de *T. brucei* por eletroporação e seleção dos transfectantes**

Um total de  $2,5 \times 10^7$  parasitas em fase logarítmica de crescimento foram utilizados por transfecção. Um volume para 3 transfecções, referentes aos plasmídeos p2T7-177-Sub<sub>2</sub>A, p2T7-177-Sub<sub>2</sub>B e o vetor usado como controle p2T7-177-GFP, foi coletado e os parasitas foram centrifugados por 10 minutos a 6.000 x g a 10 °C, lavados com o mesmo volume de tampão de eletroporação ZPFM e novamente centrifugados nas mesmas condições e suspensos em um volume de 1,5 mL do mesmo tampão. Para cada cubeta de eletroporação de 0,4 mm pré-resfriada

foram aliquotados 500 µl de parasitas e para cada alíquota foram adicionados 10 µg de DNA de cada clone de interesse previamente linearizado com *NotI*.

Esta mistura foi incubada no gelo por 10 minutos e submetida a dois pulsos de 1,6 kV com capacitância de 25 µF em eletroporador GenePulser® II Apparatus (Bio-Rad). Após a eletroporação dos parasitas, cada mistura foi respectivamente transferida para garrafas de cultura de 25 cm<sup>3</sup> contendo meio SDM-79 suplementado com SFB-10%, 50 µg/mL de higromicina e 15 µg/mL de G418. A seleção dos parasitas transfectados foi através da adição de 5 µg/mL de fleomicina, resistência conferida pelo vetor p2T7-177, após 24 horas de cultivo.

A clonagem dos parasitas mutantes foi realizada através de diluição limitante em meio SDM-79 suplementado com SFB-10%, 50 µg/mL de higromicina, 15 µg/mL de G418 e 5 µg/mL de fleomicina. Após a seleção dos mutantes, foi realizada a curva de crescimento das culturas dos parasitas transfectados com p2T7-177-GFP (controle), p2T7-177-TcSub2A e p2T7-177-TbSub2B e induzidos com tetraciclina na concentração de 2 µg/mL, seguido de 1 µg/mL nos dias posteriores.

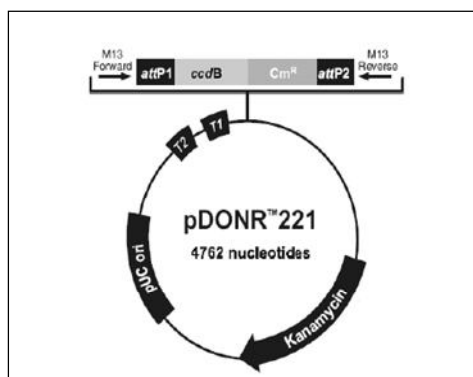
Foi realizada a contagem das culturas induzidas e não induzidas em câmara de Neubauer para observação de crescimento e possíveis alterações morfológicas após a indução do silenciamento da expressão do gene TbSub2. Os extratos proteicos das culturas induzidas e não induzidas foram posteriormente analisados quanto à diminuição da proteína TbSub2 por ensaio de *Western blot*.

### **3.13. Caracterização funcional de proteínas por métodos de localização celular em *T. cruzi***

#### **3.13.1. Expressão e purificação de proteínas recombinantes em *Escherichia coli***

A amplificação do gene TcSub2 foi obtido através de reação de PCR com oligonucleotídeos iniciadores específicos contendo sítios de recombinação *attB*, que são responsáveis pela recombinação com a sequência *attP* presente no vetor de

entrada pDONR™221 (Plataforma Gateway - Invitrogen). O mapa deste vetor está ilustrado na figura 11.



**Figura 11. Mapa do vetor de entrada pDONR™221 (Invitrogen).** pUC ori: origem de replicação de alta cópia. *attP1/attP2*: sequência de 200 bp presente no pDONOR para recombinação com sítio *attB* presente no produto PCR. *ccdB*: gene que permite seleção negativa do pDONOR, interferindo na DNA girase de *E. coli*, que é substituído após recombinação com o sítio *attB* do produto de PCR. *Kanamycin*: gene de resistência à canamicina. *Cm<sup>R</sup>*: gene de resistência ao cloranfenicol. T1/T2: terminadores de transcrição. M13 *Forward* e *Reverse*: Oligonucleotídeos iniciadores do vetor utilizados para seqüenciamento (FONTE: Catálogo Gateway® Technology Invitrogen).

A reação de amplificação do gene de TcSub2 (GenBank Gene ID: Tc00.1047053508319.40) foi realizada através de PCR de DNA genômico de *T. cruzi* e os oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados para amplificação do gene que possui 1311 pares de bases. Para permitir a recombinação do produto de PCR com a sequência *attP* do vetor de entrada, pDONR™221, foram adicionadas sequências *attB* às extremidades 5' dos oligonucleotídeos *Forward* (F) e *Reverse*®, ilustrados na figura 12.

TcSub2 F	
5'	<b>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTC</b> ATGAGCAGTGGACTTGCCGAC 3'
TcSub2 R	
5'	<b>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTATT</b> ACTGATTCATGTACTGGCTCTG 3'
Tamanho do gene: 1311 bp	

**Figura 12. Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores sintetizados para amplificação do gene TcSub2.** *Forward* (F) e *Reverse* (R). Em negrito, a sequência *attB* adicionada à região 5' de ambos oligonucleotídeos (FONTE: Catálogo Gateway® Technology Invitrogen).

Para a reação de amplificação de TcSub2 foi utilizada a ciclagem: *holding* de 95 °C por 2 minutos seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C (desnaturação),

30 segundos de 56 °C (anelamento) e 2 minutos a 72 °C (extensão). A reação foi realizada em volume final de 15 µL contendo 100 ng de DNA genômico de *T. cruzi*, 1U de High Fidelity PFU- polimerase, 200 µM de cada dNTP, 10 pmol de cada iniciador F e R, tampão para a enzima PFU e água deionizada.

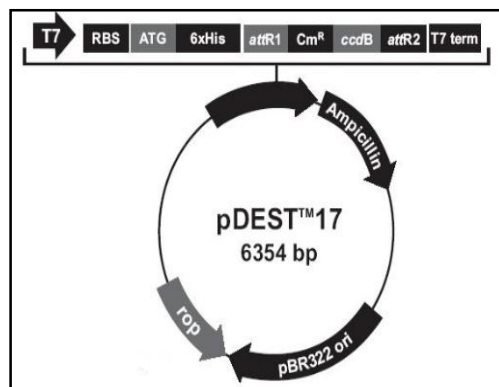
Os produtos da amplificação foram precipitados através de solução 30% PEG 8000/30 mM MgCl<sub>2</sub>, fornecido pelo sistema Gateway. Uma vez purificado o fragmento amplificado, foi possível a reação de recombinação com o vetor pDONR™221 de acordo com o manual do fabricante (Invitrogen- Catálogos 12535-019 e 12535-027).

Esta reação de recombinação foi utilizada para transformar *E. coli* DH5-α cálcio-competente, conforme descrito no item 3.9 e as bactérias foram selecionadas em meio LB-ágar adicionado de 50 µg/mL de canamicina, resistência conferida pelo vetor pDONR™221. Após o surgimento de colônias isoladas, estas foram inoculadas em 2 mL de meio LB adicionado de 50 µg/mL de canamicina, incubadas a 37 °C durante 18 horas sob agitação constante de 220 rpm e então submetidas à centrifugação a 12.000 x *g* por 1 minuto à temperatura ambiente. A minipreparação dos plasmídeos foi realizada com base no método da lise alcalina, adaptado de Birnboim e Doly (1979), purificados através do sistema Qiaprep® Spin Miniprep Kit (QIAGEN) e utilizados como molde nas reações de PCR para verificação das clonagens utilizando os oligonucleotídeos iniciadores da sequência de TcSub2 para a confirmação da clonagem. Após a verificação, o clone foi sequenciado e denominado de pDNOR-TcSub2.

Este clone foi utilizado para recombinação com outros vetores. O vetor pDONR™221 possui sequência que permite a recombinação do fragmento clonado com diferentes vetores de destino. Neste estudo, foram utilizados os vetores pDEST™17, para expressão de proteínas recombinantes, e o vetor pTcPR-GFPN, construído no ICC, utilizado para produção de proteínas fusionadas a GFP N-terminal em *T. cruzi* (Batista, em preparação).

O vetor pDEST™17 é destinado à expressão de genes em *E. coli* resultando em proteínas recombinantes, fornecendo altos níveis de proteínas contendo uma etiqueta que consiste em seis resíduos consecutivos de histidina na extremidade amino - terminal, importante para a purificação da proteína através de coluna Ni-NTA (Ni<sup>++</sup>-nitrilo-tri-acetic-acid). A alta afinidade de ligação entre as proteínas recombinantes que contêm esta etiqueta à resina permite a remoção de proteínas

inespecíficas em condições estridentes, permitindo a purificação mesmo em condições fortemente desnaturantes (CROWE; MASONE; RIBBE, 1995). Esta etiqueta de histidinas também é utilizada para confirmação das proteínas produzidas através de anticorpos monoclonais anti-histidina por ensaio de *Western blot*. O mapa do vetor pDEST<sup>TM</sup>17 está ilustrado na figura 13.



**Figura 13. Mapa do vetor pDEST<sup>TM</sup>17 (Invitrogen) de expressão de genes em bactérias** T7: Promotor de T7 RNA Polimerase. RBS: Região de ligação ao ribossomo. ATG: Códon de início. 6xHis: Etiqueta de histidinas N-terminal. sítios *attR* (*attR1* e *attR2*): região de recombinação LR com vetor de entrada pDONR. *Cm<sup>R</sup>*: gene de resistência ao cloranfenicol. *Ampicilin*: gene de resistência à ampicilina. *ccdB*: gene que permite seleção negativa do pDEST<sup>TM</sup>17. T7 term: região de término da transcrição (FONTE: Catálogo *Gateway® Technology* Invitrogen).

O gene de TcSub2 clonado em pDONR, pDONR- TcSub2, foi transferido para o vetor pDEST<sup>TM</sup>17, conforme o manual do fabricante. Após a reação de recombinação, bactérias *E. coli* DH5- $\alpha$  cálcio-competente foram transformadas, conforme descrito no item 3.9 e incubadas por 16 horas a 37 °C em meio LB-ágar adicionado de 100  $\mu$ g/mL de ampicilina, resistência conferida pelo vetor pDEST<sup>TM</sup>17. Após a obtenção de colônias isoladas, estas foram selecionadas para análise por PCR, item 3.10., utilizando os iniciadores da sequência de TcSub2 para a verificação clonagem em vetor pDEST<sup>TM</sup>17.

Após a verificação da clonagem por PCR, as colônias correspondentes foram inoculadas em 2 mL de meio LB suplementado com 100  $\mu$ g/mL de ampicilina e posteriormente incubadas a 37 °C durante 18 horas sob agitação constante de 220 rpm. Após o período de incubação, a cultura foi submetida à centrifugação a 12.000 x *g* por 1 minuto à temperatura ambiente e a minipreparação do plasmídeo foi realizada através do sistema *Qiaprep® Spin Miniprep Kit* (QIAGEN), conforme o

fabricante. Um plasmídeo purificado foi sequenciado e após a confirmação da clonagem, este foi denominado de pDEST-TcSub2. Este clone foi utilizado para transformação de *E. coli* da cepa BI21 (DE3) cálcio-competente, apropriada para a expressão de genes produzindo proteínas recombinantes através de indução por IPTG.

#### **3.13.1.1. Indução da expressão de proteínas recombinantes através de IPTG**

Uma colônia de *E. coli* da cepa BI21 (DE3) transformada com o clone pDEST-TcSub2 foi inoculada em 2 mL de meio LB adicionado de 100 µg/mL de ampicilina e incubada a 37 °C sob agitação constante de 220 rpm durante 18 horas. Após o período de incubação, 200 µL desta cultura foram transferidos para 2 mL de meio LB adicionado de 100 µg/mL de ampicilina. As células foram incubadas a 37 °C sob as mesmas condições de agitação até atingir a D.O.<sub>600</sub> de 0,6 e foi então adicionado 1 mM de IPTG à cultura e a incubação prosseguiu por mais 3 horas nas mesmas condições. Para o controle da indução de expressão do gene TcSub2, foi também mantida uma cultura nas mesmas condições mas sem adição de IPTG (cultura não induzida). Células destas culturas foram sedimentadas a 6.000 x *g* por 10 minutos a 4 °C, lavadas com PBS e suspensas em tampão de amostra para proteínas.

Para a análise de solubilidade da proteína recombinante, células da cultura induzida foram sedimentadas a 6.000 x *g* por 10 minutos a 4 °C, lavadas com PBS e suspensas em tampão de sonicação. As células foram lisadas por sonicação através de 5 ciclos de potência 5 por 15 segundos (Homogenizador 4710 - Cole Parmer) com intervalos de 2 minutos no gelo seguido de centrifugação a 6.000 x *g* por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante (fração de proteínas solúveis) e o sedimento (fração de proteínas insolúveis) foram separados e adicionados de tampão para amostra de proteínas. Todos os extratos protéicos foram desnaturados por aquecimento a 100 °C por 3 minutos. Este protocolo permitiu verificar em gel desnaturante (SDS-PAGE) a indução e a solubilidade da proteína TcSub2 recombinante.

### **3.13.1.2. Enriquecimento protéico através de lavagens com uréia e purificação de proteínas recombinantes através de coluna de Ni-NTA e gel preparativo.**

A indução da expressão de proteínas recombinantes foi de acordo com o item anterior, com modificações proporcionais para o volume final de 200 mL, seguido de indução por 1 mM de IPTG. Após o período de indução, as células foram submetidas à centrifugação a 6.000 x *g* por 10 minutos a 4 °C, o sedimento foi lavado com PBS e suspenso em 5 mL de tampão de sonicação. A lise das células foi realizada por sonicação através de 5 ciclos de potência 9 por 15 segundos, seguido de centrifugação a 6.000 x *g* por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi suspenso em tampão de purificação.

Após sucessivas lavagens com tampão de purificação, o material foi submetido à centrifugação a 6.000 x *g* por 10 minutos e o sedimento suspenso em tampão de suspensão de proteínas. Estes procedimentos de lavagens foram realizados para otimizar o enriquecimento da proteína recombinante TcSub2 na fração insolúvel. A eficiência do protocolo foi analisada através de eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE).

Após as etapas de enriquecimento, as proteínas insolúveis foram purificadas através de cromatografia por coluna Ni-NTA (AUSUBEL; BRENT; KINGSTON, 1987), utilizando o gradiente de pH dos tampões de lavagem e eluição de proteínas recombinantes conforme o fabricante - *Spin Kit Handbook* (Qiagen). Um volume total de 5 mL da fração enriquecida da fração insolúvel, foi incubado com 1 mL de resina Ni-NTA (Qiagen) sob leve agitação por 30 minutos à temperatura ambiente. Após o período de incubação, o material não ligado à resina foi coletado por gravidade e a resina foi incubada com os diferentes tampões de lavagem e eluição para a verificação da purificação de TcSub2 gel SDS-PAGE.

Devido à baixa eficiência de purificação por este tipo de cromatografia para a proteína TcSub2, uma alternativa utilizada foi a estratégia de misturar as frações eluídas da resina para aplicar em um gel preparativo de poliacrilamida (SDS-PAGE) de 15 cm de largura por 10 cm de altura. Nessas frações eluídas foram adicionadas tampão de amostra de proteínas em volume final de 5 mL e aplicadas em um único canal para eletroforese por 16 h a 20 mA. Após este período, o gel foi incubado em



solução de KCl 100 mM gelada e a região correspondente à proteína recombinante foi retirada do gel e eletroeluída por 2 horas a 60V em tampão para SDS-PAGE.

### **3.13.2. Obtenção de antisoro policlonal através de inoculação de proteína recombinante em coelhos e camundongos**

A proteína recombinante TcSub2 purificada foi utilizada para produção de antisoro específico em camundongos e coelhos. O manuseio dos animais estavam de acordo com as normas e foram aprovados pelo Comitê de ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina sob nº 47/09) - e cerca de 10 µg de proteína por camundongo foram emulsionados ao adjuvante de Freund completo para otimizar a imunogenicidade. Foram realizadas quatro inoculações em condições semelhantes, intercaladas por um período de 10 dias entre elas.

Para a produção dos antisoros em coelhos foram utilizados 100 µg de proteína por coelho a cada inoculação e foram produzidos pela empresa Célula B-Desenvolvimento de anticorpos, no Centro de Biotecnologia- UFRGS.

### **3.13.3. Ensaio de *Western blot* (TOWBIN; STAEHELIN; GORDON, 1979)**

Para a verificação da especificidade dos antisoros em relação à proteína TcSub2 presente em extratos protéicos de *T. cruzi* ou *T. brucei*, foi utilizado o ensaio de *Western blot*. Há duas maneiras de realizar este ensaio, diferindo praticamente no método de detecção, sendo a quimioluminescência considerada a detecção mais sensível.

### **3.13.3.1. Ensaio de *Western blot* através de revelação por fosfatase alcalina**

Proteínas de gel SDS-PAGE foram transferidas para a membrana de nitrocelulose através de corrente elétrica de 20 V por 16 horas a 4 °C em tampão de transferência para *Western blot*. A membrana foi então corada com solução de Ponceau S para a verificação da transferência, posteriormente descorada em água bidestilada e incubada em solução de bloqueio por uma hora sob leve agitação à temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado antisoro primário, produzido em camundongo ou coelho de reconhecimento específico a proteína TcSub2, em diferentes diluições e a incubação foi mantida por uma hora a 37 °C sob leve agitação. Para a verificação de indução de proteína recombinante fusionada à etiqueta N-terminal de histidina, foi utilizado anticorpo monoclonal anti-histidina (Gibco) na diluição de 1:3000.

A membrana foi lavada três vezes por 5 minutos com PBS-Tween 0,1% e incubada por 1 hora a 37 °C sob leve agitação com anticorpos anti-IgG de coelho ou camundongo (Promega) conjugados com a enzima fosfatase alcalina na diluição de 1:7500 (v/v) em PBS-Tween 0,1% e após o período de incubação, foi novamente lavada com PBS-Tween 0,1%.

A reação imunoenzimática foi revelada com 50 mg/mL de NBT e 50 mg/mL de BCIP em tampão da fosfatase alcalina - AP *Buffer*.

### **3.13.3.2. Ensaio de *Western blot* através de revelação por peroxidase (Quimioluminescência)**

Este ensaio possui algumas diferenças em relação ao anterior: o anticorpo secundário é conjugado com enzima peroxidase e a revelação é através de filmes de raio-X.

Após a transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose e incubação com o anticorpo primário, como citado no item anterior, foram realizadas 3 lavagens de 15 minutos com solução PBS/Tween 0,1%, seguido de incubação

com o anticorpo secundário, anti-IgG de coelho ou camundongo conjugado à peroxidase (Amersham Biosciences) na diluição de 1:8000 por 1 hora a 37 °C.

O produto da reação enzimática foi detectado por quimioluminescência, através do kit ECL *Western blotting* (Amersham Biosciences) seguindo as instruções do fabricante. A exposição foi feita em filme Kodak durante 1 minuto e a revelação foi obtida na ausência de luz, em solução de revelação seguido de lavagem por 2 minutos em água e 2 minutos em solução de fixação. Os tempos de revelação foram padronizados para cada experimento.

#### **3.13.4. Expressão e localização celular de proteína fusionada a GFP N-terminal em *T. cruzi***

A metodologia de expressão de proteínas fusionadas a GFP foi uma abordagem paralela à utilização de anticorpos, que teve como objetivo a localização de proteínas em *T. cruzi* através de fluorescência.

O gene de TcSub2 foi fusionado a GFP N-terminal em vetor pTcPR-GFPN que permite a recombinação com o inserto clonado em vetor pDONR™221-TcSub2, conforme o fabricante (Invitrogen- Catálogos 12535-019 e 12535-027), citado no item 3.13.1.

A confirmação da clonagem foi através de PCR de colônia, como descrito no item 3.10, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores de TcSub2. Após a obtenção do clone pTcPR-GFPN-TcSub2 através da purificação do plasmídeo pelo sistema<sup>®</sup> *Spin Miniprep Kit* (QIAGEN), este foi sequenciado e utilizado para a transfecção de *T. cruzi* utilizando 50 µg do DNA para a eletroporação, segundo o item 3.12.1. Uma vez selecionados os parasitas transfectantes, as formas epimastigotas foram visualizadas diretamente em microscopia ótica de fluorescência em comprimento de onda de 488 nm.

Para esta visualização, foi necessário a incubação das lamínulas com poli-L-lisina. Após lavagens com PBS para retirar o excesso de poli-L-lisina, os parasitas foram lavados, suspensos em PBS e aderidos por 20 minutos à lamínula. As lamínulas foram submetidas a lavagens com PBS e os parasitas aderidos foram fixados com paraformaldeído 4% em PBS por 5 minutos. Para a coloração da

cromatina, os parasitas fixados foram incubados com 10 mg/mL de DAPI em temperatura ambiente por 5 minutos, seguido de lavagens com PBS. Foi adicionado n-propil-galato como meio de montagem à superfície das lâminas de vidro e em seguida as lamínulas foram vertidas e seladas.

As lâminas foram observadas em microscópio de fluorescência (Nikon) e as imagens foram capturadas com câmera CoolSnap (Media Cybernetics) e analisadas com o programa Image Pro-Plus v. 4.5.1.22 (Media Cybernetics).

### **3.13.5. Imunolocalização celular por microscopia ótica de fluorescência e confocal**

Para a visualização de localização da proteína endógena através de antisoro, foi utilizado o protocolo de imunofluorescência como descrito por Holetz e colaboradores (2007).

A preparação das lamínulas, adesão e fixação dos parasitas, necessárias para posteriores incubações com os antisoros, foram realizadas conforme o item anterior. Após a etapa de fixação dos parasitas, foi adicionada uma solução de Triton X-100 0,1% durante 90 segundos para a permeabilização destes. Posteriormente, as lamínulas foram lavadas por imersão em PBS e bloqueadas com PBS contendo soro de cabra 25% por 16 horas a 4 °C em câmara úmida.

Após o período de bloqueio, as lamínulas foram lavadas e incubadas por uma hora a 37 °C com antisoro anti-TcSub2, produzido em coelho ou camundongo, diluído 1:1000. Em seguida, as lâminas foram lavadas com PBS e incubadas por uma hora a 37 °C com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho ou anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa 594 ou Alexa 488 (Invitrogen) diluído 1:400. Para a coloração da cromatina as lamínulas foram incubadas com 10 µg/mL de DAPI em PBS à temperatura ambiente por 5 minutos seguido de lavagens com PBS. Foi adicionado n-propil-galato ou VectaShield como meio de montagem à superfície de lâminas de vidro e em seguida as lamínulas foram vertidas e seladas.

Imagens bidimensionais foram obtidas no microscópio Nikon Eclipse 90i equipado com objetiva 100x/1.4 PlanApoVC de imersão a óleo e câmera DS-Nikon

QiMc, controlada pelo software NIS-Elements AR. As imagens foram adquiridas de modo que os valores de intensidade dos pixels permaneceram entre 0 e 255 (ou seja, sem saturação do sinal) a partir da utilização da função de autoexposição combinada com LUTs, disponível no software NIS-Elements.

Imagens tridimensionais (séries Z) foram adquiridas em um microscópio confocal Leica TCS SP2 AOBS equipado com objetiva 63x/HCX 1.4 PL Apo lbdBL de imersão a óleo. O diafragma foi ajustado para 1,00 *airy* e a fluorescência emitida por DAPI e Alexa 488 foi adquirida por dois fóton-multiplicadores (PMTs) de forma independente e sequencial. Para detecção de cromatina pelo sinal de DAPI, foi utilizado um laser diodo de 405 nm e a emissão foi adquirida em 415-485 nm. Para detecção de sinal de BrRNA indiretamente marcado por Alexa 488 (Invitrogen), foi utilizado laser de argônio com excitação a 488 nm e a emissão foi adquirida em 515-570nm. Um laser DPSS de 561 nm foi usado para excitação de estruturas indiretamente marcadas por Alexa 594, sendo a emissão neste caso detectada em 570-645 nm.

A fim de melhorar a razão sinal/ruído, cada “fatia ótica” da série Z foi composta pela média de 16 *frames* (função *frame average*) de 512 x 512 pixels cada. As imagens foram adquiridas em 8 bits, com *voxels* de 58x58x122 nm (simplificadamente, o voxel é um pixel com 3 dimensões – X, Y e Z). Após a aquisição, imagens 2D e 3D foram montadas e tratadas com o software ImageJ (ABRAMOFF; MAGELHAES; RAM, 2004) para a remoção do ruído (função *rolling ball radius* ajustada em 50) e para realce do contraste.

#### **3.13.5.1. Marcação de RNA nascente *in situ* por incorporação de BrUTP**

A incorporação de 5-bromouridina 5'-trifosfato (BrUTP) em *T. cruzi* foi realizada de acordo com o protocolo de Dossin e Schenkman (2005), com pequenas modificações.

Foram utilizados  $1 \times 10^7$  parasitas para cada reação de incorporação. Os parasitas foram centrifugados a  $4.000 \times g$  por 2 minutos a temperatura ambiente, lavados em tampão de lavagem gelado e suspensos em 50  $\mu$ L de tampão de

lavagem seguido de adição de 1,5  $\mu$ L de 5 mg/mL de lisofosfatidilcolina (lisolecitina, Sigma) para permeabilização dos parasitas. Após homogenização por inversão, foram incubados por 2 minutos no gelo e em seguida visualizados no microscópio para avaliação da mobilidade – idealmente, os parasitas deviam ter sua mobilidade diminuída total ou parcialmente. Os parasitas permeabilizados foram centrifugados a 6.000 x g por 2 minutos a 4 °C e suspensos em 95  $\mu$ L de tampão de marcação. Como controles, foram adicionados 75  $\mu$ g/mL ou 200  $\mu$ g/mL de  $\alpha$ -amanitina a algumas amostras seguido de incubação a 28 °C sob agitação constante de 220 rpm por 4 minutos anterior à adição de BrUTP. Essa concentração de  $\alpha$ -amanitina sabidamente inibe a transcrição por RNA Pol II e RNA pol III respectivamente, mas não a transcrição por RNA Pol I (CAMPBELL; THOMAS; STURM, 2003). Em seguida, foram adicionados para cada reação: 40 mM de ATP, 20 mM de GTP, 20 mM de CTP e 20 mM de BrUTP, seguido de incubação a 28 °C sob agitação constante de 220 rpm por 15 minutos. As células foram então fixadas por 1 hora com PBS-paraformaldeído 4 %. Os parasitas foram centrifugados a 8.000 x g por 2 minutos e lavados com PBS e em seguida submetidos ao ensaio de imunofluorescência. Para a detecção de BrRNAs (RNAs nascentes marcados com BrU) foi utilizado o anticorpo monoclonal de camundongo anti-bromodeoxiuridina (anti-BrdU) clone PRB1 (Invitrogen) seguido de incubação com antisoro anti-IgG de camundongo-Alexa 488 (Invitrogen), diluído 1:200. Para os ensaios de colocalização de TcSub2 com os sítios ativos de transcrição a imunofluorescência de TcSub2 (descrita no item anterior) foi combinada com a detecção de BrRNA, utilizando antisoro anti- TcSub2 produzido em coelho seguido de incubação com anti IgG de coelho conjugado com Alexa 594 (Invitrogen).

### **3.13.6. Localização celular por imunocitoquímica ultraestrutural**

Os parasitas foram fixados em 0,3% de glutaraldeído, 4% de formaldeído e 1% de ácido pícrico diluídos em tampão cacodilato 0,1 M pH 7,2. Após lavagem neste mesmo tampão, as células foram desidratadas a -20°C em concentrações crescentes de etanol (30%, 50%, 70%, 90% e 2x 100%) a 4 °C, por 1 hora em cada etapa. Em seguida, o material foi progressivamente infiltrado em Unicryl a baixa

temperatura: etanol 100%: resina Unicryl (2:1) a -20 °C por 16 horas; etanol 100%: resina Unicryl (1:1) por 8 horas a -20 °C e etanol 100%: Unicryl (1:2) a -20°C por 16 horas. Posteriormente, o material foi incluído em resina pura a -20 °C e a polimerização da resina foi feita em cápsulas BEEM a 20 °C por 72 horas, sob luz UV. Cortes ultrafinos foram obtidos com um ultramicrotomo Leica (Reichert Ultracuts) e as grades contendo as seções foram incubadas com 50 mM NH<sub>4</sub>Cl por 30 minutos. As amostras foram então incubadas com solução de bloqueio contendo BSA 3%, gelatina de peixe 0,5% e Tween 20 0,02% diluídos em PBS, pH 8,0 por 30 minutos. Em seguida o material foi incubado com antisoro anti-TcSub2 produzido em coelho diluído 1:200 em solução de bloqueio por 1 hora. As grades foram então tratadas por 30 minutos em tampão de bloqueio e depois incubadas por 45 minutos com IgG anti-coelho acoplado a partículas de ouro coloidal de 10 nm diluído 1:250 em solução de bloqueio. No controle, a incubação do material com o antisoro primário foi omitida. Após o procedimento imunocitoquímico, as grades foram contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo e observadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss 900.

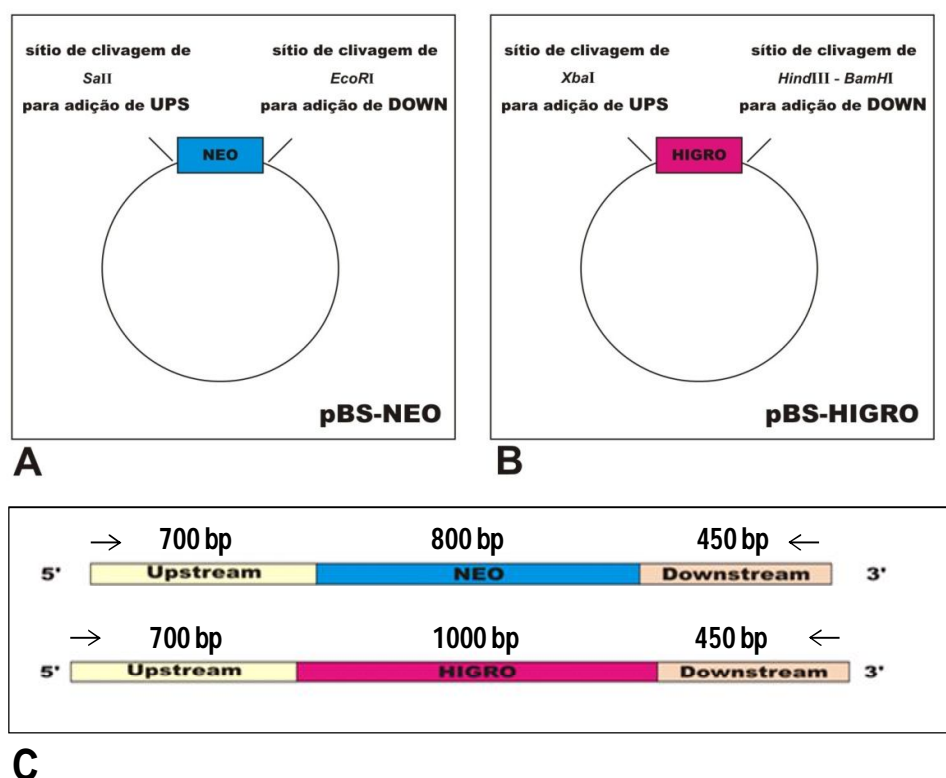
### **3.14. Caracterização funcional de proteínas por abordagens de genética reversa**

#### **3.14.1. Avaliação da viabilidade de manipulação por nocaute gênico em *T. cruzi***

O silenciamento de genes por nocaute mediado por recombinação homóloga é uma metodologia de genética reversa que vem sendo utilizada para estudar a função de genes em *T. cruzi* (MACRAE *et al.*, 2006), mas a viabilidade da metodologia depende da estrutura e função do gene. A organização do gene TcSub2 foi o primeiro item a ser avaliado e foi verificado que este gene possui cópia única no genoma de *T. cruzi*.

Para a clonagem das regiões intergênicas, foram utilizados vetores pBlueScript já contendo gene *npt*, que codifica a enzima neomicina fosfotransferase

e confere resistência ao antibiótico neomicina - G418 (NEO), e gene *hph*, que codifica a enzima higromicina fosfotransferase que confere resistência ao antibiótico higromicina B (HIGRO), construídos no ICC (SOUZA, em preparação). Estes genes de resistência foram então flanqueados por regiões intergênicas do gene de TcSub2 a jusante (*downstream* - DOWN) e a montante (*upstream* - UPS). O esquema dos vetores utilizados para as clonagens das regiões intergênicas e da construção a ser obtida para a estratégia de nocaute podem ser observados na figura 14.



**Figura 14. Esquema de vetores e construção para a estratégia de nocaute em *T. cruzi*.** A: Ilustração de vetor pBlueScript (pBS) contendo gene *npt* (NEO) – pBS-NEO - com os devidos sítios de restrição para a clonagem das regiões intergênicas. B: Ilustração de vetor pBlueScript contendo gene *hph* (HIGRO) – pBS- HIGRO - com os devidos sítios de restrição para a clonagem das regiões intergênicas. C: Ilustração da construção dos genes de resistência flanqueados pelas regiões intergênicas com os respectivos tamanhos indicados em pares de bases (BP). Em amarelo a região intergênica *upstream* do gene TcSub2. Em laranja a região intergênica *downstream* do gene TcSub2. Após ambas as clonagens, os genes de resistência tornam-se flanqueados pelas regiões intergênicas. As setas indicam a direção dos oligonucleotídeos iniciadores para amplificação do fragmento a ser utilizado para a transfecção de *T. cruzi*, para o nocaute dos alelos do gene TcSub2.

Os oligonucleotídeos iniciadores dos genes de neomicina (NEO) e higromicina (HIGRO) foram utilizados para confirmação da orientação de clonagem e iniciadores foram desenhados para amplificar as regiões intergênicas *upstream* e



*downstream* do gene TcSub2. A estes iniciadores foram adicionados sítios de enzimas de restrição apropriados na extremidade 5' para permitir que os produtos de PCR fossem coesivos com os vetores pBS-NEO e pBS-HIGRO após a digestão de ambos com as mesmas enzimas. Estes oligonucleotídeos iniciadores estão mostrados na figura 15.

Nome do oligonucleotídeo	Sequência (5' - 3')	Enzimas de Restrição	Tamanho do amplicon (bp)
NEO F	GGG <b>GTCTGAC</b> ATGATTGAACAAGATGGATTG	<i>SaI</i>	800
NEO R	GGG <b>GAATTC</b> AGAAGAACTCGTCAAG	<i>EcoRI</i>	
HIGRO F	AGCT <b>TCTAGAA</b> TGAAAAAGCCTGAACTCACC	<i>XbaI</i>	1000
HIGRO R	TCGGTCG <b>GAATCC</b> ACTCTATTCCTTTGC	<i>BamHI</i>	
UPS-NEO F	GGG <b>GTCTGAC</b> GGTGTTATTTGCGTCACGATGTGC	<i>SaI</i>	700
UPS-NEO R	GGG <b>GCTGACT</b> TGCTTATGTCTATCTGGTTTCTTA	<i>SaI</i>	
UPS HIGRO F	GGG <b>TCTAGAG</b> GTTATTTGCGTCACGATGTGC	<i>XbaI</i>	700
UPS-HIGRO R	GGG <b>CTCTAGAT</b> TGCTTATGTCTATCTGGTTTCTTA	<i>XbaI</i>	
DOWN-NEO F	GGG <b>GAATTC</b> GATTTAAGGCCTCTGGAAAATAAGAATGAGG	<i>EcoRI</i>	450
DOWN-NEO R	GGG <b>GAATTC</b> AACACAAAAATAAGAAGAAGTATTGGAATGGCAATTGC	<i>EcoRI</i>	
DOWN-HIGRO F	GGG <b>GGATCC</b> GATTTAAGGCCTCTGGAAAATAAGAATGAGG	<i>BamHI</i>	450
DOWN-HIGRO R	GGG <b>AAGCTT</b> AACACAAAAATAAGAAGAAGTATTGGAATGGCAATTGC	<i>HindIII</i>	

**Figura 15. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados.** As siglas correspondem aos genes *npt* (NEO) e *hph* (HIGRO). *UPS*: iniciadores da região intergênica *upstream* do gene TcSub2. *DOWN*: iniciadores da região intergênica *downstream* do gene TcSub2. *Forward* (F). *Reverse* (R). Os sítios de restrição estão em negrito e as respectivas enzimas de restrição correspondentes estão indicadas.

As regiões intergênicas foram amplificadas por PCR, tendo como molde 100 ng de DNA genômico de *T. cruzi* através de enzima *Taq* DNA polimerase. As reações foram realizadas em volume final de 20 µL, contendo tampão de reação com MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 200 µM de cada dNTP, 10 pmol de cada iniciador F e R e *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) 2,5 U. Para a ciclagem da reação de PCR foi padronizado o tempo de extensão de 72 °C por 1 minuto para cada 1 Kb do fragmento a ser amplificado.

As clonagens foram realizadas por etapas (detalhadas nos itens a seguir). Após a finalização das construções, os plasmídeos foram utilizados como molde para amplificação dos fragmentos, delimitados pelas setas na figura 14 C. Após a obtenção de maior quantidade de DNA foi possível a purificação através de excisão de gel 0,8 % seguido de eletroeluição a 20 mV durante 4 horas. A transfecção e seleção dos parasitas mutantes foram realizadas conforme item 3.12.1.

#### 3.14.1.1. Clonagem de região *upstream* em vetor pBlueScript-NEO

Para a amplificação por PCR da região *upstream* foram utilizados os iniciadores UPS-NEO F e UPS-NEO R (Figura 15) com a ciclagem de: *holding* de 94 °C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 60 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto.

Foi digerido 1 µg deste produto de PCR com 3 U de enzima *Sall* (Amersham Biosciences) em solução contendo tampão H em volume final de 40 µL. A reação foi incubada a 37 °C por 16 horas e a purificação do DNA digerido com o auxílio do kit – *High Pure PCR Product Purification Kit* da Roche. O vetor pBS-NEO (FIGURA 14 A) foi digerido e purificado nas mesmas condições. Após purificado, 1 µg do vetor foi desfosforilado com 1U de enzima SAP - *Shrimp Alkaline Phosphatase* - (Promega) em volume final de 50 µL. Para inativação da enzima esta reação foi incubada a 65°C por 15 minutos.

Para a reação de ligação, foi utilizada a proporção de 1:5 em pmol de vetor e inserto digeridos, respectivamente, adicionado de 1 U de T<sub>4</sub> DNA ligase (USB), 1 µL de tampão 10X da T<sub>4</sub>DNA ligase em volume final de 10 µL. A incubação foi realizada

por 16 horas a 16 °C e esta reação foi utilizada para transformar bactérias DH5α cálcio-competentes, conforme item 3.9.

A verificação da clonagem foi realizada através do método de palitagem, descrito no item 3.11 e os possíveis plasmídeos recombinantes foram posteriormente purificados utilizando o sistema Qiaprep<sup>®</sup> *Spin Miniprep Kit* (QIAGEN) conforme as recomendações do fabricante. A confirmação da orientação de clonagem da região *upstream* nestes plasmídeos foi feita por PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores UPS-NEO F e NEO R (FIGURA 15). A ciclagem utilizada foi de: *holding* de 94 °C por 3 minutos seguido de 30 ciclos de 94 °C a 30 segundos, 55 °C por 30 segundos e 72 °C por 2 minutos. Esta construção foi denominada de pBS-UPS-NEO.

#### **3.14.1.2. Clonagem de região *downstream* em clone pBS-UPS-NEO**

Para a reação de amplificação da região intergênica *downstream* de TcSub2 a ser clonada em vetor pBS-UPS-NEO foram utilizados os iniciadores DOWN-NEO F e DOWN-NEO R (Figura 15). A ciclagem utilizada foi de: *holding* de 94 °C por 3 minutos seguido de 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 58 °C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos.

A digestão do produto de PCR foi realizada por 3 U da enzima de restrição *EcoRI* (New England Biolabs) em solução com 4 µL de tampão NEB 3 em volume final de 40 µL. A reação foi incubada nas mesmas condições citadas no item anterior, bem como a purificação do DNA digerido. O clone pBS-UPS-NEO foi digerido e purificado nestas mesmas condições. Em seguida, 1µg deste vetor clonado foi desfosforilado e para a reação de ligação, foram mantidas as condições citadas no item anterior, bem como a transformação de bactérias DH5α cálcio-competentes.

A verificação da clonagem foi realizada através do método de palitagem, item 3.11, e os plasmídeos de possíveis clones foram posteriormente purificados. A confirmação da orientação de clonagem da região *downstream* nestes plasmídeos foi através de PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores UPS-NEO e DOWN-

NEO R (FIGURA 15) com a ciclagem: *holding* de 94 °C por 3 minutos seguido de 30 ciclos de 94 °C a 30 segundos, 55 °C por 30 segundos e 72 °C por 2 minutos.

Para a transfecção de *T. cruzi*, foi realizada uma reação de PCR de maior volume, obedecendo proporcionalmente às concentrações utilizando os iniciadores UPS-NEO F e DOWN-NEO R, como citado acima, para a obtenção do fragmento de DNA conforme esquematizado na figura 14 C.

#### **3.14.1.3. Clonagem de região *upstream* em vetor pBlueScript-HIGRO**

Para a amplificação por PCR da região *upstream* foram utilizados os iniciadores UPS-HIGRO F e UPS HIGRO R (Figura 15) com a ciclagem de: *holding* de 94 °C por 3 minutos seguido de 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 60 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto.

Foi digerido 1 µg deste produto de PCR por 3 U de enzima *Xba*I (New England Biolabs) em solução, 3 µL de tampão NEB2, 0,3 µL de BSA em volume final de 30 µL. A reação foi incubada nas mesmas condições citadas no item anterior, bem como a purificação do DNA digerido. O vetor pBS-HIGRO (FIGURA 14 B) foi digerido nas mesmas condições e posteriormente purificado e desfosforilado como descrito no item anterior.

Após a ligação, foram transformadas bactérias DH5α cálcio-competentes, conforme item 3.9 e a verificação da clonagem foi realizada através do método de palitagem, conforme item 3.1. Os plasmídeos de possíveis clones foram posteriormente purificados e a confirmação da orientação de clonagem da região *upstream* nestes plasmídeos foi através de PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores UPS-HIGRO F e HIGRO R (Figura 15). Para a reação de PCR foi utilizada a ciclagem citada no item 3.14.1.1. Esta construção foi denominada de pBS-UPS-HIGRO.

#### 3.14.1.4. Clonagem de região downstream em clone pBS-UPS-HIGRO

Para a reação de amplificação da região intergênica *downstream* de TcSub2 para clonagem em vetor pBS-UPS-HIGRO foram utilizados os iniciadores DOWN-HIGRO F e DOWN-HIGRO R, indicados na figura 15. A ciclagem foi de: *holding* de 94 °C por 3 minutos seguido de 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos.

Foi digerido 1 µg deste produto de PCR com 3 U de enzima *HindIII* e 3 U de enzima *BamHI* (New England Biolabs) em solução contendo tampão NEB 2 (New England Biolabs) em volume final de 60 µL de reação. A reação foi incubada nas mesmas condições citadas acima, seguido de purificação deste DNA. O clone pBS-UPS-HIGRO foi digerido e purificado nas mesmas condições e em seguida desfosforilado conforme descrito anteriormente.

Após a ligação foram transformadas bactérias DH5α cálcio-competentes, conforme item 3.9 e para a verificação da clonagem foi realizada reações de PCR de colônias isoladas, após seleção com o antibiótico, utilizando os primers DOWN HIGRO F e DOWN HIGRO R (Figura 15). Como controle positivo de clonagem foi utilizado o próprio PCR de DNA genômico de *T. cruzi* de amplificação da região intergênica *downstream* de TcSub2. Os plasmídeos de possíveis clones foram purificados para posterior confirmação da orientação da clonagem.

Para a confirmação da região *downstream* nestes plasmídeos, foi realizada reação de PCR utilizando os iniciadores UPS-HIGRO F e DOWN-HIGRO R (FIGURA 15) com a ciclagem: *holding* de 94 °C por 2 minutos seguido de 30 ciclos de 94 °C a 1 minuto, 55 °C por 30 segundos e 72 °C por 2 minutos.

Para a transfecção de *T. cruzi*, foi realizada uma reação de PCR de maior volume, obedecendo proporcionalmente às concentrações utilizando os iniciadores UPS-HIGRO F e DOWN-HIGRO R, como citado acima, para a obtenção do fragmento de DNA conforme esquematizado na figura 14 C.

### 3.14.1.5. Verificação de nocaute gênico por *Southern blot* (SOUTHERN, 1975) e *Western blot*

A separação dos cromossomos de *T. cruzi* foi feita através de eletroforese em campo pulsado. Foram preparados 20 blocos contendo  $2 \times 10^7$  parasitas cada um. Para estas preparações foi utilizado o clone *Dm28c* WT como controle, bem como parasitas transfectados e clonados para o nocaute do gene *TcSub2* (KO).

As células foram centrifugadas por 15 minutos a  $5.000 \times g$  e lavadas 2 vezes com NKM pH 8,0. Após as lavagens, foram suspensas em 600  $\mu$ l de solução PSG e foi adicionado igual volume de solução PSA 1% aquecido a 37 °C. Esta suspensão foi imediatamente aplicada em um molde de 20 orifícios para a solidificação da agarose, resultando em pequenos blocos, cada um representando uma amostra.

Estes blocos foram depositados em 10 mL de solução de lise, previamente digerida durante 1 hora a 37 °C, incubados a 50 °C por volta de 50 horas. Os blocos foram estocados nesta solução a 4 °C. Cada bloco utilizado para a análise foi lavado 3 vezes com 50 mM de EDTA pH 8,0 por uma hora antes de ser aplicado no gel de eletroforese.

Para a preparação do gel de eletroforese, foi utilizado gel de agarose 1,2% em TBE 0,5x. Os blocos foram aplicados no gel e selados com agarose 1%. Como marcador molecular foi utilizado o 345 Yeast Chromosome PFG Marker de 225 a 1900 Kb (New England Biolabs).

O tampão de corrida TBE 0,5X foi previamente resfriado a 4 °C e a eletroforese seguiu um programa com cinco fases de tempos crescentes de pulsos (N/S, E/W) por 135h a 83 V - *interpolation*. Fase 1 teve pulso de 90 s (30 h); fase 2, 200 s (30 h); fase 3, 350 s (25 h); fase 4, 500 s (25 h) e fase 5, 800 s (25 h).

Os cromossomos foram transferidos pelo método de *Southern blot*. O tratamento do gel contendo o DNA consistiu de incubações consecutivas das seguintes soluções: HCl 0,25 M por 15 minutos, solução de neutralização de NaOH 0,5 M e NaCl 1,5 M por 30 minutos com 2 repetições e solução de Tris-HCl 0,5 M pH 7.5 e NaCl 1,5 M por 30 minutos. A transferência do DNA para as membranas de náilon (Hybond- Amershan) foi realizada durante 16 horas por capilaridade utilizando tampão SSC 20X. Após a transferência, o DNA foi fixado na membrana com luz UV

(302 nm) e, em seguida, foi realizada pré - hibridação por 1 hora a 65 °C com solução de hibridação.

As sondas para a hibridação foram amplificadas por PCR e marcadas radioativamente pela técnica de *nick translation* - *Nick Translation System* (Invitrogen). Estas reações continham 100 ng de DNA, 2,5 U DNA Polimerase I, 2 mU DNase I, dNTPs (exceto dCTP) 0,1 mM cada, 20 a 80  $\mu$ Ci de dCTP $\alpha$  32P e H<sub>2</sub>O para completar 50  $\mu$ L. Em seguida, incubou-se a 16 °C por 1 hora em banho seco e fez-se a purificação centrifugando-se por 2 minutos a 2.000 x g em colunas de resina G-50 (Invitrogen). A seguir, as amostras foram desnaturadas com incubação a 99 °C por 5 minutos e imediatamente em gelo por 5 minutos. Foram utilizadas como sondas fragmentos referentes aos genes de TcSub2 e *nph* de resistência à neomicina (NEO). A radioatividade incorporada foi quantificada por cintilação líquida, confirmando atividade específica em torno de 10<sup>8</sup> c.p.m/ $\mu$ g.

A hibridação com as sondas, concentração final de 10<sup>6</sup> c.p.m/mL, foi realizada durante 16 horas nas mesmas condições da pré-hibridação. Após a hibridação, as membranas foram lavadas 6 vezes por 15 minutos na mesma temperatura de hibridação com SSC 2x e SDS 0,1%, decrescendo a concentração de SSC a cada 2 lavagens (2x, 1x, 0,1x). A exposição foi feita em filme Kodak durante 24 horas no gelo seco e a revelação foi obtida na ausência de luz, incubando-se os filmes por 2 minutos em solução de revelação, por 2 minutos em água e por 2 minutos em solução de fixação.

Para avaliar se o nocaute de um dos alelos do gene TcSub2 foi suficiente para diminuir o nível de expressão da proteína, foram preparados extratos de proteína de Dm28c *Wild-type* (WT) e Nocaute simples (KO). Para a eletroforese em gel SDS-PAGE, a quantidade aplicada de proteína de cada amostra foi normalizado em relação ao número de parasitas (5 x 10<sup>6</sup> parasitas por canal). As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose para ensaios de *Western blot* e incubadas com antisoro de camundongo anti-TcSub2 na diluição de 1:600 e antisoro de camundongo anti-TcGAPDH na diluição de 1:200, utilizado como normalizador para a quantificação. O *Western blot* foi revelado por quimioluminescência, como descrito no item 3.13.3.2.

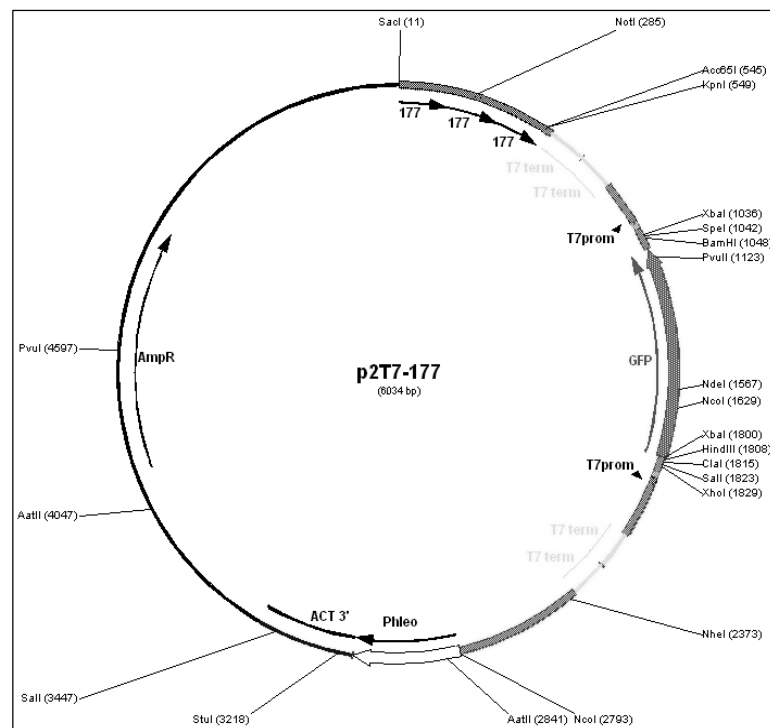
A quantificação da expressão de proteína entre as diferentes amostras WT e KO foi realizada através programa *Scion Image* que permite comparar a quantidade de pixels entre as amostras. Neste caso a comparação dos pixels foram referentes

às quantidades de pixels entre os resultados de TcGAPDH e TcSub2 de *T. cruzi* em ambas as amostras WT e KO.

**3.14.2. Análise do fenótipo causado pelo silenciamento, por interferência de RNA (RNAi), de genes de *T. brucei* ortólogos aos genes identificados em *T. cruzi*.**

Visto a ausência de maquinaria de RNAi em *T. cruzi* (daROCHA *et al.*, 2003), uma abordagem alternativa à análise da função gênica é o uso dessa metodologia para genes ortólogos de *T. brucei* por análises de RNAi. Os resultados podem gerar evidências que estejam relacionadas à funcionalidade do gene em *T. cruzi* (NARDELLI *et al.*, 2007, BALAÑA-FOUCE; REGUERA, 2007). Esta abordagem foi utilizada neste trabalho para auxiliar no estudo da função do gene TcSub2 a partir de um ortólogo em *T. brucei* ainda não caracterizado, TbSub2. Os ensaios de RNAi foram realizados em *T. brucei*, cepa 29-13, com sistema induzido por tetraciclina utilizando o vetor p2T7-177, ilustrado na figura 16.



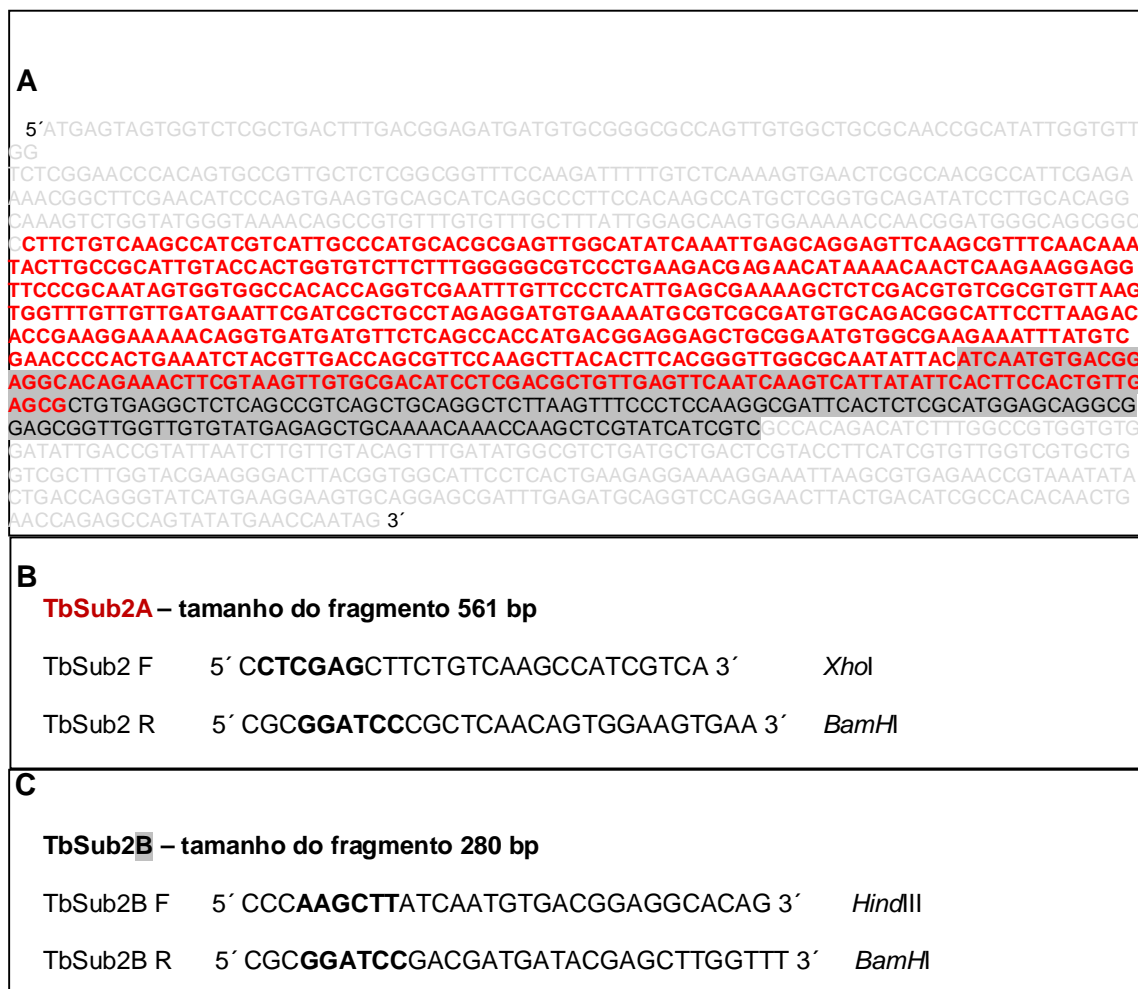


**Figura 16. Mapa do vetor p2T7-177 utilizado para ensaios de RNAi.** T7 prom: Promotor de T7 RNA Polimerase induzido por tetraciclina. T7 term: Terminador de transcrição. 177: Sequência repetitiva de 177 pares de bases para alvo de inserção em minicromossomos. Phleo: gene de resistência à fleomicina. GFP: Proteína *Green Fluorescent Protein*, os sítios para as enzimas de restrição estão indicados. AmpR: gene de resistência à ampicilina (FONTE: WICKSTEAD; ERSFELD, K.; GULL, 2002).

Foram escolhidas duas regiões do mRNA para alvos nos ensaios de RNAi: uma de 561 pares de bases, denominada TbSub2A, identificada com o auxílio da ferramenta RNAit da base de dados do Trypanofan - Genômica funcional de *T. brucei* (<http://trypanofan.path.cam.ac.uk/trypanofan/main/>) (REDMOND; VADIVELU; FIELD, 2003). A outra correspondente a 280 pares de bases, denominada TbSub2B, que corresponde a uma parte de TbSub2A com nucleotídeos adicionais em direção à extremidade 3'.

Na extremidade 5' dos iniciadores da região TbSub2A foram inseridos os sítios de restrição para as enzimas *XhoI* e *BamHI* e na extremidade 5' dos iniciadores de TbSub2B foram inseridos os sítios de restrição para *HindIII* e *BamHI*, ambos os casos com estratégia de clonagem no vetor p2T7-177. Paralelamente, foi verificada a ausência do sítio de *NotI* nos fragmentos selecionados, pois foi a enzima utilizada para linearização do vetor para posterior transfecção em *T. brucei*. As

regiões utilizadas para o desenho dos iniciadores e as respectivas sequências estão ilustradas na figura 17.



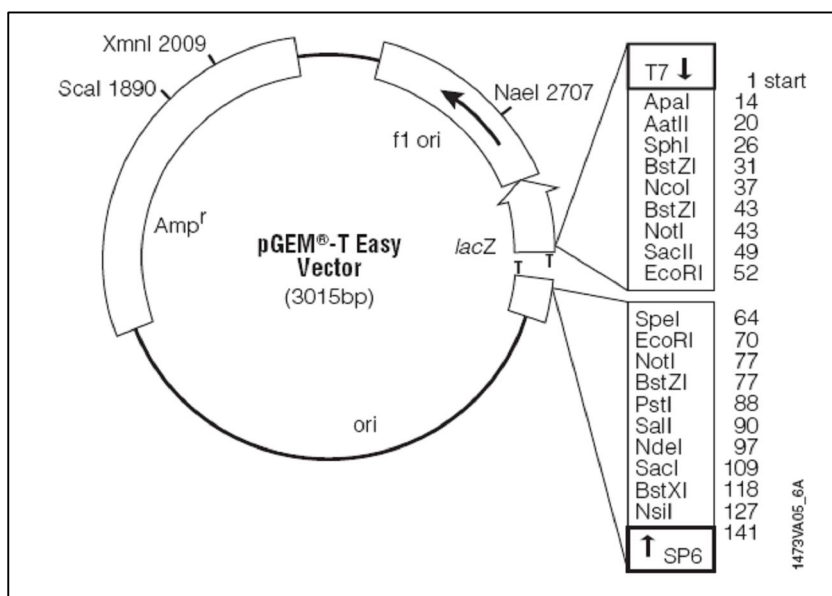
**Figura 17. Regiões utilizadas para desenho dos oligonucleotídeos iniciadores das regiões TbSub2A e TbSub2B.** A: Sequência de nucleotídeos do gene TbSub2 (Genbank ID Tb10.70.7730). As letras em vermelho delimitam a região escolhida através da ferramenta RNAit, denominado TbSub2A, utilizada para desenho dos iniciadores indicados em B. Em destaque cinza a região denominada TbSub2B escolhida para o desenho dos iniciadores indicados em C. Em negrito os sítios de restrição das enzimas indicadas à direita adicionados à região 5' dos oligonucleotídeos iniciadores Forward (F) e Reverse (R).

Para as reações de amplificação por PCR foram utilizados 100 ng de DNA de *T. brucei* (previamente preparado e estocado no laboratório) em um volume de reação de 20 µL contendo: tampão de reação, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 200 µM de cada dNTP, 10 pmol de cada iniciador F e R e *Taq* DNA polimerase 2,5 U (Invitrogen).

Para a amplificação de TbSub2A foi utilizada a ciclagem: *holding* de 94 °C por 3 minutos seguido de 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 58 °C por 30 segundos e

72 °C por 1 minuto. Para a amplificação de TbSub2B foi utilizada a mesma ciclagem com mudança apenas no tempo de extensão que foi alterada para 30 segundos. Nas duas reações de amplificação, após os 35 ciclos, foi adicionado *holding* de 72 °C por 10 minutos, que permite a adição de adeninas à extremidade 3' do produto da amplificação necessário para subclonagem em vetor pGEM® – T easy (Promega), ilustrado na figura 18. A ligação do produto de PCR no vetor seguiu as recomendações do fabricante.

Obs: esta etapa de subclonagem em pGEM - Teasy foi utilizada para obtenção dos insertos a serem clonados em vetor p2T7-177 além de ajudar na confirmação por sequenciamento das sequências amplificadas.



**Figura 18. Mapa do vetor pGEM® – Teasy utilizado para as subclonagens.** T7: Região de iniciação da transcrição por T7 RNA Polimerase. 14-141: Múltiplo sítio de clonagem. SP6: Promotor da SP6 RNA Polimerase. LacZ: Códon inicial de LacZ. Amp<sup>r</sup>: Gene de resistência à ampicilina. F1 ori: origem de replicação de bacteriófago filamentosos (FONTE: Manual Promega).

As ligações foram utilizadas para transformar *E. coli* DH5α cálcio-competentes, como descrito no item 3.9. As células transformadas foram cultivadas em meio LB-ágar adicionado de 100 µg/mL de ampicilina contendo IPTG X-gal e, após o período de incubação, foi observada a formação de algumas colônias brancas isoladas. Foram purificados alguns plasmídeos dessas colônias por Qiaprep® *Spin Miniprep Kit* (QIAGEN), conforme as recomendações do fabricante para a análise de subclonagem, através de digestões.

Para a liberação do inserto TbSub2A clonado, o plasmídeo correspondente ao clone pGEM-TbSub2A foi realizada a digestão com a enzima *Bam*HI (New England Biolabs). Essa reação foi realizada em 30 µL, contendo NEB 3, BSA 0,01%, 3µg de DNA e 24 U de enzima. A reação foi incubada a 37 °C por 3 horas. Posteriormente, realizou-se digestão utilizando-se a segunda enzima de restrição, *Xho*I (New England Biolabs). A reação ocorreu em um volume de 50 µL, contendo tampão NEB 2 (New England Biolabs), 3 µg de DNA e 20 U de enzima, e foi incubada a 37 °C por 4 horas.

Para a liberação do inserto TbSub2B clonado, o plasmídeo correspondente ao vetor pGEM-TbSub2B foi realizada a digestão com *Hind*III (Amersham Biosciences). Essa reação foi realizada em 30 µL, contendo tampão M (Amersham Biosciences), 3 µg de DNA e 24 U de enzima. A reação foi incubada a 37 °C por 2 horas e inativada a 65 °C por 15 minutos. Posteriormente, realizou-se digestão utilizando-se a segunda enzima de restrição *Bam*HI (New England Biolabs). A reação ocorreu em um volume de 50 µL, contendo tampão NEB 3 (New England Biolabs), BSA 0,1 %, 3 µg de DNA e 24 U de enzima. A reação foi então incubada a 37 °C por 18 horas.

Após a verificação de subclonagem, estes plasmídeos foram sequenciados, digeridos nas mesmas condições acima e submetidos à eletroforese em gel de agarose. A região do gel correspondente ao inserto liberado foi excisada e o DNA foi purificado com o auxílio do kit *High Pure PCR Product Purification Kit* da Roche. Após purificados, estes insertos TbSub2A e TbSub2B foram ligados ao vetor p2T7-177 previamente digerido com as mesmas enzimas.

Para a reação de ligação, foi utilizada a relação de 1:10 pmol de vetor p2T7-177 e inserto. A reação ocorreu com 1 U de T<sub>4</sub> DNA ligase em um volume final de 10 µL. Esta reação foi incubada a 16 °C durante 18 horas e posteriormente utilizada para transformar *E. coli* DH5α cálcio-competentes, como descrito no item 3.9. As bactérias transformadas foram cultivadas em LB contendo 100 µg/mL de ampicilina, resistência conferida pelo vetor p2T7-177.

Para a confirmação dos clones positivos, as colônias isoladas foram analisadas por PCR conforme citado no item 3.10, utilizando iniciadores específicos dos respectivos fragmentos. Os plasmídeos correspondentes aos clones positivos foram purificados através do sistema *Qiaprep*<sup>®</sup> *Spin Miniprep Kit* (QIAGEN),

conforme o fabricante, e denominados de p2T7-177-TbSub2A e P2T7-177-TbSub2B.

Aproximadamente 10µg dos clones p2T7-177-TbSub2A, TbSub2B e do vetor controle p2T7-177-GFP (FIGURA 16) foram linearizados com a enzima *Not* I (New England Biolabs). A reação ocorreu em 60 µL contendo 10 U de enzima *Not*I, 6 µL de tampão 10X e água deionizada. A reação foi incubada a 37 °C por 16 horas.

Após a digestão o DNA foi precipitado e suspenso em tampão de eletroporação ZPFM para transfecção de *T. brucei*. A transfecção e posterior seleção de *T. brucei* foi realizada conforme descrito no item 3.12.2.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Identificação de proteínas envolvidas na exportação de RNA em organismos basais, entre eles *T. cruzi*, através de análises de genômica comparativa.

A maioria dos trabalhos que caracterizam vias de exportação de mRNAs engloba estudos feitos em organismos-modelo, com isso, poucos dados existem a respeito das vias em eucariotos basais, ou seja, que divergiram no início na evolução de eucariotos. Por isso, a primeira etapa deste trabalho buscou avaliar a conservação dos componentes das vias de exportação de mRNA, visando ao direcionamento das proteínas candidatas a serem os alvos para estudo funcionais em tripanossomatídeos. Para tanto, escolhemos uma abordagem de genômica comparativa mais ampla e completa com sequências de componentes das vias de exportação de diferentes tipos de RNAs, incluindo mRNA. Baseado em dados da literatura foi elaborada uma lista de proteínas de *S. cerevisiae* e *H. sapiens* que foram organizadas na tabela 3 de acordo com seu envolvimento em determinada via de exportação de RNA. Conforme citado no item 3.1.1, as sequências das proteínas de *S. cerevisiae* funcionalmente caracterizadas e descritas na literatura, bem como as proteínas ortólogas em humanos também funcionalmente caracterizadas e posteriormente confirmadas pelo Ensembl, foram obtidas através de banco de dados disponíveis no *National Center of Biotechnology Information* (NCBI). A exceção foi a proteína – PHAX, que está descrita funcionalmente apenas em humanos e foi escolhida para analisar a aquisição tardia em eucariotos superiores.

Durante esta etapa, foram analisadas as proteínas relacionadas às vias de exportação de mRNAs, rRNAs, tRNAs, miRNAs, snRNAs e snoRNAs. Alguns componentes específicos da via de exportação pela exportina-1 (CRM1) também foram analisados, visto que esta via está relacionada majoritariamente à exportação de proteínas em eucariotos superiores e apenas alguns mRNAs em situações de estresse. Foram analisadas também proteínas componentes do complexo transcricional SAGA, que é específico em fungos e serviu para fins de validação dos critérios utilizados para a análise. Algumas proteínas estão presentes em mais de

uma via de exportação e, por isso, apresentam-se repetidas na tabela quando necessário.

**TABELA 3. LISTA DE PROTEÍNAS DE *S. cerevisiae* (Sce) E *H. sapiens* (Hsa) UTILIZADAS COMO *QUERIES*, ORGANIZADAS POR VIAS DE EXPORTAÇÃO DE RNAs.** As proteínas de humanos não confirmadas pelo Ensembl (-) não foram utilizadas para análise (células em cinza). ID: Número de identificação da proteína no GenBank. Sce\_ID\_*queries*; Hsa\_ID\_*queries*: IDs das sequências utilizadas como *queries* para análise.

Evento	Via	Sce - evidência experimental	Hsa_evidência experimental	Confirmação de Hsa pelo Ensembl	Sce_ID <i>queries</i>	Hsa_ID <i>queries</i>
Transcrição	SAGA	SGF11	ATXN7L3	-	NP_015278.1	
		SGF73	Ataxin 7	-	NP_011449.1	
		UBP8	HsUSP33	USP33	NP_013950.1	NP_055832.3
		TAF6	-	-	NP_011403.1	
		TAF10	TAF10	TAF10	NP_010451.1	NP_006275.1
		TAF12	TAF12	TAF12	NP_010429.1	NP_001128690.1
		TRA1	TRAPP	TRRAP	NP_011967.1	NP_003487.1
		GCN5	CeCR2	CeCR2	NP_011768.1	NP_113601.2
		HF11	-	-	NP_015069.1	
		TAF9	TAF9	TAF9	NP_013963.1	NP_001015891.1
		TAF5	TAF5	?	NP_009757.1	NP_008882.2
		SPT7	-	-	NP_009637.1	
		NGG1	-	-	NP_010461.1	
		SPT20	-	-	NP_014493.1	
		CHD1	CHD8	CHD8	NP_011091.1	NP_065971.2
Exportação de mRNA	TREX-2	Cdc31	CETN3	CETN3	NP_014900.1	NP_004356.2
		Sac3	MCM3AP	MCM3AP	NP_010443.1	NP_003897.2
		Thp1p	-	-	NP_014569	
		Sus1p	ENY2	-	NP_878049.2	
	Nucleoporinas associadas a TREX-2	Nup1	Nup214	Nup214	NP_014741.1	NP_005076.3
		Nup60	-	-	NP_009401.1	
	Complexo THO	Rlr1p (THO2)	THOC2	THOC2	NP_014260.1	NP_065182.1
		THO1p	-	-	NP_010985.1	
		Hpr1	THO1	-	NP_010422	
		Mf1	-	-	NP_013649	
		Thp2	-	-	NP_012037	
		Sub2	UAP56 (Bat1)	BAT1 -	NP_010199	NP_004631.1
		Yra 1	Aly	-	NP_010669.1	
		Tex1p	THOC3	THOC3	NP_014146	NP_115737.1
		Sto1	CBP80 (NCBP1)	NCBP1	NP_013844	NP_002477.1
		Cbc2	CPB20 (NCBP2)	NCBP2	NP_015147.1	NP_031388
	Fatores adicionais de exportação de mRNA	Dbp5	DDX19	DDX19	NP_014689.1	NP_060802.1
		Gle1	GLE1	-	NP_010074	
		Gle2	Rae1	Rae1	NP_011033.1	NP_003601.1
		Mex67	TAP (NXF1)	NXF1	NP_015156.1	NP_006353.2
		Mtr2	p15 or NXT1	-	NP_012735.1	
		Nab2	ukp68	-	NP_011393.1	
		Sem1	SHFM1	SHFM1	NP_010651.1	NP_006295.1
		Npl3	9G8	-	NP_010720.1	
		Mlp2	CCDC88C	CCDC88C	NP_012117.1	NP_001073883.2
		Mlp1	TPR	TPR	NP_013021.1	NP_003283.2
		Hrb1 (Protein TOM34)	HNRNPM	HNRNPM	NP_014394.2	NP_005959.2
		Nup159	Nup214	-	NP_012151.1	
		Gbp2	HRNPM	HNRNPM	NP_009916.1	NP_005959.2
		Lea1	U2A	-	NP_015111.1	
		Rsp5	NEDD4	NEDD4	NP_011051.1	NP_006145.2
		Tom1	HECT	HECT	NP_010745.1	NP_113584.3
Exportação de tRNA		Gsp1	Ran	Ran	NP_013396	NP_006316.1
		Rna1	RanGAP	RanGAP1	NP_013962	NP_002874.1
		CRM1	Exportina 1 - XPO1	XPO 1	NP_011734	NP_003391.1
		Msn5	Exportina-5 - XPO5	XPO5	NP_010622.1	NP_065801.1
		Tef2	EEF1A	EEF1A	NP_009676.1	NP_001393.1
		Los1	Exportina-t - XPOt	XPOt	NP_012717.1	NP_009166.2
Exportação de rRNA		Gsp1	Ran	Ran - NM_006325	NP_013396	NP_006316.1
		Rna1	RanGAP	RanGAP1	NP_013962	NP_002874.1
		Mex67	TAP (NXF1)	NXF1	NP_015156.1	NP_006353.2
		Mtr2	p15 or NXT1	-	NP_012735.1	
		Nmd3	NMD3	NMD3	NP_012040	NP_057022.2
		CRM1	Exportina - XPO1	XPO1	NP_011734	NP_003391.1
		Rei1	ZNF622	ZNF622	NP_009825	NP_219482.1
		Arx1	-	-	NP_010386.1	
		ALB1	-	-	NP_012413.1	
		Gsp1	Ran	Ran	NP_013396	NP_006316.1
CRM1		CRM1	Exportina - XPO1	XPO 1	NP_011734	NP_003391.1
		Sec13	SEC13	SEC13	NP_013309.1	NP_899195.1
		NTF2	pp15	PP15	NP_010925.1	NP_005787.1
		Sxm1	CSE1	CSE1	NP_010683	NP_001307.2
		Yrb1	RanBP1	RanBP1	NP_010285.1	NP_002873.1
		Yrb2	RanBP1	RGFP3	NP_012201.1	
		Rna1	RanGAP	RanGAP1	NP_013962	NP_002874.1
		Srm1	RCC1	RCC1	NP_011418	NP_060661.3
		Msn5	Exportina-5 - XPO5	XPO5	NP_010622.1	NP_065801.1
		Gsp1	Ran	Ran	NP_013396	NP_006316.1
Exportação de miRNA		Rna1	RanGAP	RanGAP1	NP_013962	NP_002874.1
		Rnt1	Drosha	-	NP_013966.1	
		CRM1	Exportina - XPO1	XPO1	NP_011734	NP_003391.1
Exportação de snRNA/snoRNA			PHAX			NP_115553.2
		Gsp1	Ran	Ran	NP_013396	NP_006316.1





**TABELA 5. ANÁLISE COMPARATIVA DE SEQUÊNCIAS DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA VIA DE EXPORTAÇÃO DE mRNAs AO LONGO DA FILOGENIA DE EUCARIOTOS.** Na Primeira linha: Os supergrupos eucarióticos com as devidas espécies utilizadas para análise. Sce: *S. cerevisiae*. Hsa: *H. sapiens*. SC: Sem Classificação. NH: Não houve *Hits* para a análise. Os resultados foram analisados conforme critérios do item 3.1.2.

		Animalia					Fungi			Plantae		Amoebozoa		Chromalveolate							Excavate					
		Hsa	Mmu	Cin	Cel	Dme	Spo	Cgl	Ncr	Ath	Cme	Ehi	Ddi	Pte	Tps	Tgo	Pfla	Tpa	Cho	Ehu	Gth	Gla	Tva	Tbr	Lma	Ten
TRES-2	Queries																									
	Hsa_Cetn3	1	1	1	1	4	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	NH	1	1	1	1	1
	Sce_Cdc31	1	1	SC	1	4	1	1	2	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	NH	1	1	1	1	1
	Hsa_MCM3AP	1	1	3	5	4	5	5	5	4	5	SC	5	5	4	5	NH	5	5	5	NH	SC	5	5	5	NC
	Sce_Sac3	4	4	4	4	4	3	1	4	4	4	4	4	4	4	SC	4	5	SC	5	NH	SC	5	NH	SC	5
	Hsa-sem ortólogo																									
	Sce_Thp1p	4	4	4	3	4	3	1	SC	4	3	NH	4	3	4	3	NH	NH	NH	NH	NH	NH	NH	NH	NH	NH
THO	Hsa-sem ortólogo																									
	Sce_Sus1p	2	2	2	NH	2	2	NH	NH	SC	NH	NH	2	NH	NH	NH	NH	NH	NH	2	NH	NH	NH	NH	NH	NH
	Hsa_THOC2	1	1	1	2	2	3	4	4	3	5	5	4	3	3	5	4	5	5	3	NH	5	5	5	5	5
	Sce_Rlr1p	4	4	4	3	4	3	1	4	4	NH	4	4	4	4	NH	4	SC	SC	NH	NH	NH	4	5	NH	NH
	Hsa-sem ortólogo																									
	Sce_THO1	SC	4	3	SC	SC	3	2	4	4	3	3	4	4	3	4	4	SC	SC	4	NH	SC	4	SC	NH	4
	Hsa-sem ortólogo																									
	Sce_Hpr1p	4	SC	SC	SC	5	NH	2	SC	5	NH	5	SC	SC	NH	SC	5	SC	SC	NH	NH	NH	4	SC	NH	NH
	Hsa-sem ortólogo																									
	Sce_Mif1p	4	4	4	3	4	4	2	3	4	4	5	5	4	4	4	4	4	4	4	NH	4	4	5	4	5
	Hsa-sem ortólogo																									
	Sce_Thp2	NH	SC	NH	NH	NH	NH	1	NH	NH	NH	SC	NH	SC	NH	NH	SC	SC	NH	NH	NH	NH	SC	NH	NH	NH
	TRES	Hsa_UAP56	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4	2	2	1	1	1
Sce_Sub2		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4	2	2	1	1	1	1
Hsa-sem ortólogo																										
Sce_Yra1p		3	3	3	3	3	3	1	2	3	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	NH	NH	4	SC	SC	SC
	Hsa_THOC3	1	1	1	2	1	2	3	3	1	3	3	4	4	4	4	4	3	4	3	3	3	3	3	3	4
	Sce_Tex1	3	3	4	3	3	4	1	SC	3	4	3	3	4	SC	SC	SC	3	NH	NH	SC	4	3	SC	SC	SC
	Adaptadores de exportação de mRNA	Hsa_TAP	1	1	2	2	3	3	3	3	SC	SC	4	4	5	NH	SC	SC	NH	5	NH	NH	NH	5	SC	4
	Sce_Mex67	4	4	4	4	3	3	1	3	NH	NH	3	4	5	NH	5	5	SC	5	SC	NH	NH	SC	5	5	4
Fatores adicionais de exportação	Hsa-p15																									
	Sce_Mtr2p	NH	NH	NH	NH	NH	NH	1	NH	NH	NH	NH	NH	NH	NH	NH	NH	NH	NH	NH	NH	NH	NH	NH	NH	NH
	Hsa_DDX19	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	2	2	4	1	1	1	2	2	2	1	2	1
	Sce_Dbp5	1	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	1	2	2	2	4	2	1	2	2	1	2	2	2	2
	Hsa-sem ortólogo																									
	Sce_Gle1	5	5	3	4	3	2	1	5	4	4	5	4	4	4	5	5	4	3	5	5	5	4	5	4	5
	Hsa_Rae1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	2	3	1	4	2	3	5	2	2	3	5	3	3	3	3	3
	Sce_Gle2	2	2	2	2	1	1	1	1	2	2	3	1	4	2	3	5	2	2	2	4	3	2	3	3	3
	Hsa_TPR	1	1	2	4	3	3	3	3	3	4	3	3	3	3	3	4	3	4	4	SC	3	4	4	4	3
	Sce_Mlp1	3	3	3	4	3	3	2	3	3	4	3	3	3	3	4	4	3	3	4	SC	4	4	3	4	4
	Hsa-sem ortólogo																									
	Sce_Nab2	5	5	5	5	4	5	1	5	5	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	NH	5	5	5	4	5
	Hsa_HNRNPM	1	1	3	4	3	4	4	4	4	4	5	4	4	4	4	4	4	4	4	5	SC	4	4	5	4
	Sce_Gbp2	4	4	5	4	4	3	1	2	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	3	4	4	3	4	4

Como apresentado nas tabelas 4 e 5, a análise comparativa permitiu perceber que algumas proteínas de *S. cerevisiae* e *H. sapiens* apresentam conservação em termos de estrutura primária ao longo de toda a filogenia de eucariotos incluindo os eucariotos basais, entre eles *T. cruzi*. Um grupo de proteínas altamente conservadas, classificadas como 1 ou 2 ao longo da filogenia, inclui proteínas pertencentes às vias dependentes de RanGTP (TABELA 4) como Ran e a exportina CRM1, componentes comuns às vias de rRNA, tRNA, snRNA e proteínas, além de Nmd3, parceira de CRM1 na exportação de rRNA. Apesar disto, existem também

componentes de vias dependentes de RanGTP que não estão conservadas, como é o caso das exportinas das vias de exportação de miRNA e tRNA, Msn5 e Los1 respectivamente.

Quanto às proteínas específicas da via de exportação de mRNA, ou seja, do grupo que não depende de RanGTP, foi observado que a maioria das proteínas não é conservada ao longo da filogenia de eucariotos, incluindo *T. cruzi*. Apenas duas proteínas são altamente conservadas: Sub<sub>2</sub> e Dbp<sub>5</sub>, homólogas respectivamente de UAP56 e DDX19 em humanos, ambas pertencentes ao grupo de RNA helicases.

Em virtude do foco do trabalho ser a análise de componentes da via de exportação de mRNA em *T. cruzi*, optou-se por priorizar as análises na proteína com maior conservação que foi Sub<sub>2</sub> - SceSub<sub>2</sub>/HsaUAP56. Foi analisado então com maior detalhe o resultado de alinhamento com a proteína de *T. cruzi* (GenBank ID XP\_808002). Esta proteína está anotada no banco de dados do projeto genoma do *T. cruzi* como RNA helicase hipotética e apresenta massa molecular predita de 49 kDa. Os resultados de BLASTP mostraram que esta proteína possui 49% de identidade e 68% de similaridade quando comparada à SceSub<sub>2</sub> (GenBank ID NP\_010199). Com relação ao ortólogo em humano, UAP56 - HsaUAP56 (GenBank ID NP\_004631.1), foi observado que a sequência de *T. cruzi* possui 51 % de identidade e 69 % de similaridade. Como as buscas foram baseadas em sequências de leveduras decidimos denominar a ortóloga de *T. cruzi* de TcSub2.

Foi realizado um alinhamento múltiplo utilizando o programa CLUSTALW (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994) com proteínas identificadas a partir de BLASTP utilizando TcSub2 como *query*. Dentre essas proteínas estão as ortólogas em *S. cerevisiae* (Sub<sub>2</sub>), em *H. sapiens* (UAP56), bem como proteínas similares a TcSub2 mas ainda não caracterizadas funcionalmente em organismos-modelo e em outros tripanossomatídeos. Através deste alinhamento múltiplo foi possível observar a conservação em termos de estrutura primária desta proteína em *T. cruzi* e também a conservação dos motivos característicos de proteínas da família RNA helicases. O resultado pode ser observado na figura19.

TcSub2	.....MSSG.....LADFDGDD.....VKVPVIVAAQPHM	24
TbSub2	.....MSSGLADFDGDD.....VRAPVVAAQPHI	24
Lma	.....MSSGLADFDGDD.....VRTTVVAAQPM	23
PfaUAP56	.....DVDNELDVEDE.....VETAAAGDGAAPAK	32
HsaUAP56	MAEN.....GEDLLDYSDNEQEIQIDASKAAEAGETGAATSATEDNNNTAA	49
SceSub2	MGDARDNEAYEEELDYEEED.....EKVPDSGNKVNG...	33
Ath	MAETN.PEVDISELAEYEEES.....DEEVQNDVTDTKNKT	35
Ddi		
<b>Q</b>		
TcSub2	GVGMGTHSAVALGGQDFCLKSELANATRENQFEHPSEVQHQAIPQAMLCADIL	78
TbSub2	GVGLGTHSAVALGGQDFCLKSELANATRENQFEHPSEVQHQAIPQAMLCADIL	78
Lma	GVGMGTHSAVALGGQDFCLKSELANATRENQFEHPSEVQHQAIPQAMLCADIL	77
PfaUAP56	KDVKGSYVSIHSSGRDQLLPPELLRAIVDCQFEHPSEVQHECIPQAAILCMDVL	86
HsaUAP56	QDKKGSYVGIHSTGKDFLLKPELSRAIIDCQFEHPSEVQHTIPQSIHCTDVL	103
SceSub2	EAVKKGYYVGIHSSGRDQLLPPELLRAIVDSQFEHPSEVQHECIPQAAILCMDVI	87
Ath	ANRRADTHVAMHSSGREPELLKPELERVIGDCQFEHPSEVQNECIPQAAILCTDVI	89
Ddi		
<b>I</b>		
TcSub2	AJAKSGMGKTAFFVFALLQETEK.....VPEGCKPHCQGGIVVV	116
TbSub2	PGRCSLTERALDVSRLKRVVSPDCLDVKMRDVCQTAPLKPFPKQVMM	122
Lma	AJAKSGMGKTAFFVFALLQETEK.....VPQCKPYCQAVULV	115
PfaUAP56	CJAKSGMGKTAFFVFLSLQQLDNTENQDMQDTEKMNNDNNNNNDKNFVRCGLA	80
HsaUAP56	CJAKSGMGKTAFFVFLSLQQLD.....PVTGQ.....VSFLVLMC	120
SceSub2	CJAKSGMGKTAFFVFLSLQQLD.....PVPGE.....VAVVVIC	137
Ath	CJAKSGMGKTAFFVFLSLQQLD.....PSPPG.....VSALVLC	121
Ddi	CJAKSGMGKTAFFVFLSLQQLD.....NNPNG.....ITTLVLC	123
<b>Ia</b>		
TcSub2	HARELAYQTEQEFKRFNKYLYCTTCVFFGGVPEDENVKQLKK...EVPAIVVGT	168
TbSub2	HARELAYQTEQEFKRFNKYLYCTTCVFFGGVPEDENVKQLKK...EVPAIVVGT	168
Lma	HARELAYQTEQEFKRFNKYLYCTTCVFFGGVPEDENVKQLKK...EVPAIVVGT	167
PfaUAP56	HTRELAYQTEQEFKRFNKYLYCTTCVFFGGVPEDENVKQLKK...EVPAIVVGT	133
HsaUAP56	HTRELAYQTEQEFKRFNKYLYCTTCVFFGGVPEDENVKQLKK...EVPAIVVGT	172
SceSub2	HTRELAYQTEQEFKRFNKYLYCTTCVFFGGVPEDENVKQLKK...EVPAIVVGT	191
Ath	HTRELAYQTEQEFKRFNKYLYCTTCVFFGGVPEDENVKQLKK...EVPAIVVGT	173
Ddi	HTRELAYQTEQEFKRFNKYLYCTTCVFFGGVPEDENVKQLKK...EVPAIVVGT	175
<b>Ib</b>		
TcSub2	PGRSALIQRLALDVSRLKRVVSPDCLDVKMRDVCQTAPLKPFPKQVMM	222
TbSub2	PGRSALIQRLALDVSRLKRVVSPDCLDVKMRDVCQTAPLKPFPKQVMM	222
Lma	PGRKALINQAFDTTHVKVFFVDECDCLDVKMRDVCQTAPLKPFPKQVMM	221
PfaUAP56	PGRILALIREKYLITDKIQHVFVDECDCLDVKMRDVCQTAPLKPFPKQVMM	187
HsaUAP56	PGRILALIREKYLITDKIQHVFVDECDCLDVKMRDVCQTAPLKPFPKQVMM	226
SceSub2	PGRILALIREKYLITDKIQHVFVDECDCLDVKMRDVCQTAPLKPFPKQVMM	245
Ath	PGRILALIREKYLITDKIQHVFVDECDCLDVKMRDVCQTAPLKPFPKQVMM	227
Ddi	PGRILALIREKYLITDKIQHVFVDECDCLDVKMRDVCQTAPLKPFPKQVMM	229
<b>III</b>		
TcSub2	FSATMTDEIRNVAKKFMNNPTEIYVDRQAKLTLHGLAQYVMNVTEAQKLRKLC	276
TbSub2	FSATMTDEIRNVAKKFMNNPTEIYVDRQAKLTLHGLAQYVMNVTEAQKLRKLC	276
Lma	FSATMTDEIRNVAKKFMNNPTEIYVDRQAKLTLHGLAQYVMNVTEAQKLRKLC	275
PfaUAP56	FSATMTDEIRNVAKKFMNNPTEIYVDRQAKLTLHGLAQYVMNVTEAQKLRKLC	241
HsaUAP56	FSATMTDEIRNVAKKFMNNPTEIYVDRQAKLTLHGLAQYVMNVTEAQKLRKLC	280
SceSub2	FSATMTDEIRNVAKKFMNNPTEIYVDRQAKLTLHGLAQYVMNVTEAQKLRKLC	299
Ath	FSATMTDEIRNVAKKFMNNPTEIYVDRQAKLTLHGLAQYVMNVTEAQKLRKLC	281
Ddi	FSATMTDEIRNVAKKFMNNPTEIYVDRQAKLTLHGLAQYVMNVTEAQKLRKLC	283
<b>IV</b>		
TcSub2	ILDVVEFNQALIFTSVERCEALNRQLQMKFPAIAHSRMEQERLRVYESCK	330
TbSub2	ILDVVEFNQALIFTSVERCEALNRQLQMKFPAIAHSRMEQERLRVYESCK	330
Lma	ILDVVEFNQALIFTSVERCEALNRQLQMKFPAIAHSRMEQERLRVYESCK	329
PfaUAP56	ILDVVEFNQALIFTSVERCEALNRQLQMKFPAIAHSRMEQERLRVYESCK	295
HsaUAP56	ILDVVEFNQALIFTSVERCEALNRQLQMKFPAIAHSRMEQERLRVYESCK	334
SceSub2	ILDVVEFNQALIFTSVERCEALNRQLQMKFPAIAHSRMEQERLRVYESCK	353
Ath	ILDVVEFNQALIFTSVERCEALNRQLQMKFPAIAHSRMEQERLRVYESCK	335
Ddi	ILDVVEFNQALIFTSVERCEALNRQLQMKFPAIAHSRMEQERLRVYESCK	337
<b>V</b>		
TcSub2	SNHTRIVATDLEFGRGVDIRNLVQVQFDMASDADSLHVRVGRAGRFGTKGLTI	384
TbSub2	TNQARIIVATDLEFGRGVDIRNLVQVQFDMASDADSLHVRVGRAGRFGTKGLTI	384
Lma	KFENRILVATDLEFGRGVDIRNLVQVQFDMASDADSLHVRVGRAGRFGTKGLTI	349
PfaUAP56	DFQRRILVATDLEFGRGVDIRNLVQVQFDMASDADSLHVRVGRAGRFGTKGLTI	388
HsaUAP56	DFQRRILVATDLEFGRGVDIRNLVQVQFDMASDADSLHVRVGRAGRFGTKGLTI	407
SceSub2	DFQRRILVATDLEFGRGVDIRNLVQVQFDMASDADSLHVRVGRAGRFGTKGLTI	389
Ath	DFQRRILVATDLEFGRGVDIRNLVQVQFDMASDADSLHVRVGRAGRFGTKGLTI	391
Ddi	DFQRRILVATDLEFGRGVDIRNLVQVQFDMASDADSLHVRVGRAGRFGTKGLTI	391
<b>VI</b>		
TcSub2	AFITIDEKEIKRENRYTDGQIMKEVQERFEMQVQELTDIATQLNQSQYMNQ	436
TbSub2	AFITIDEKEIKRENRYTDGQIMKEVQERFEMQVQELTDIATQLNQSQYMNQ	436
Lma	AFITIDEKEIKRENRYTDGQIMKEVQERFEMQVQELTDIATQLNQSQYMNQ	435
PfaUAP56	TFVSS.....QEDTLAINEVQRFEMQVQELTDIATQLNQSQYMNQ	387
HsaUAP56	TFVSS.....QEDTLAINEVQRFEMQVQELTDIATQLNQSQYMNQ	428
SceSub2	TFVSS.....QEDTLAINEVQRFEMQVQELTDIATQLNQSQYMNQ	446
Ath	TFVSS.....QEDTLAINEVQRFEMQVQELTDIATQLNQSQYMNQ	427
Ddi	TFVSS.....QEDTLAINEVQRFEMQVQELTDIATQLNQSQYMNQ	428

Figura 19. Verificação da conservação de TcSub2 ao longo da filogenia de eucariotos através de alinhamento múltiplo de estruturas primárias de proteínas similares a TcSub2 de organismos-modelo e tripanossomatídeos. Os motivos característicos de RNA helicases estão destacados em vermelho com os nomes indicados acima de cada motivo. TcSub2 – *T. cruzi* (NP\_808002.1), TbSub2 – *T. brucei* (XP\_822312.1), Lma – *L. major* (NP\_XP\_001683110.1), Pfa – *P. falciparum* (XP\_001349607.1), HsaUAP56 – *H. sapiens* (NP\_004631.1), SceSub2 – *S. cerevisiae* (NP\_010199.1), Ath – *A. thaliana* (NP\_568245.1), Ddi – *D. discoideum* (XP\_646415.1). As letras representam os aminoácidos. G: Glicina. P: Prolina. R: Arginina. Q: Glutamina. S: Serina. A: Alanina. V: Valina. Y: Tirosina. E: Ácido Glutâmico. D: Aspartato. N: Asparagina. T: Treonina. L: Leucina. I: Isoleucina. F: Fenilalanina. C: Cisteína. K: Lisina. H: Histidina. W: Triptofano. M: Metionina. Os destaques em preto e cinza indicam aminoácidos idênticos e similares, respectivamente.

Após esse alinhamento, foi observado que a proteína de *T. brucei* (GenBank ID Tb10.70.7730) possui 89% de identidade e 96 % de similaridade com relação à proteína TcSub2 e foi verificado que ambas estão incluídas em um mesmo grupo de proteínas no banco de dados de ortólogos do OrthoMCL, onde fazem parte também as ortólogas SceSub2 e HsaUAP56.

Para confirmação da ortologia entre *T. cruzi* e *T. brucei*, foi feita análise de sintenia genômica entre alguns tripanossomatídeos através dos resultados depositados nos bancos de dados do TritypDB, citado em 3.1.3. Foi observado que os genes ortólogos de TcSub2 estão presentes nos cromossomos 10 em diferentes tripanossomatídeos e da mesma forma, genes vizinhos estão em sintenia genômica entre as diferentes espécies, como ilustrado na figura 20. Após a confirmação de ortologia, tanto por alinhamento quanto por sintenia genômica em relação a TcSub2, a proteína de *T. brucei* foi denominada de TbSub2 e escolhida para as análises posteriores neste trabalho.

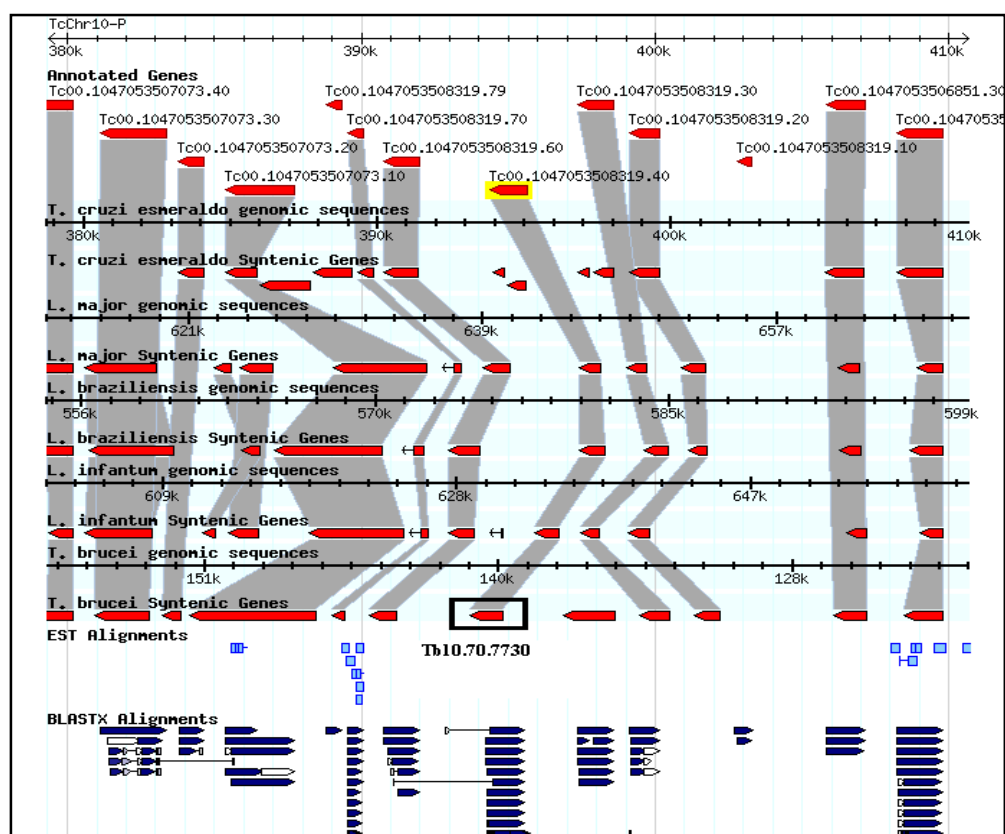
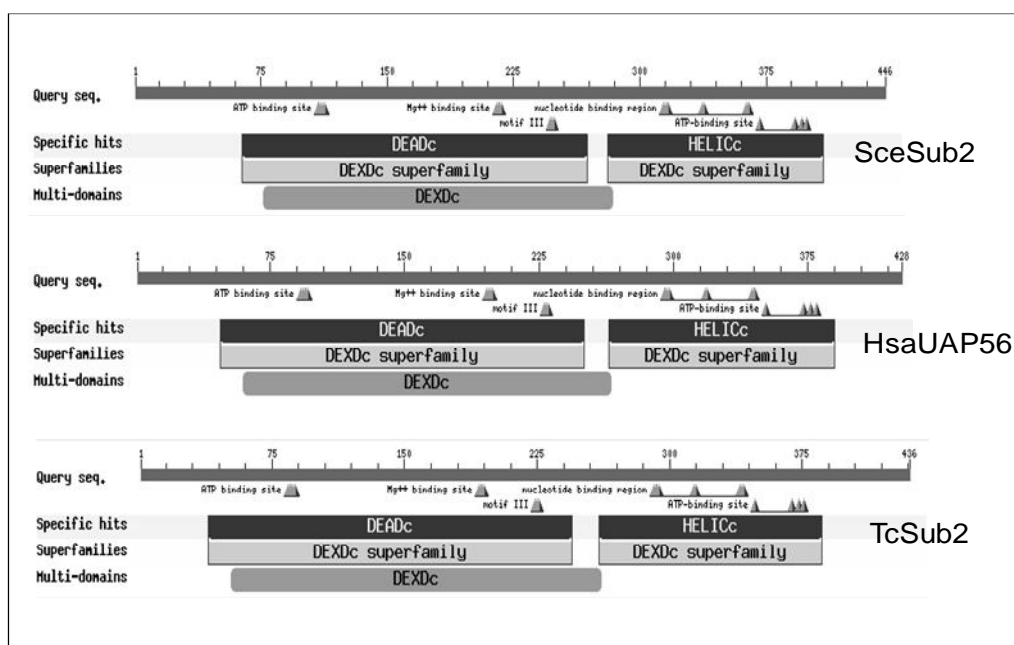


Figura 20. Análise de sintenia de TcSub2 em *Leishmania spp* e *T. brucei*. Destacado em amarelo está o gene TcSub2 e por um retângulo está o gene de *T. brucei*, TbSub2. Os dados foram obtidos através do banco de dados TritypDB (AURRECOECHEA *et al.*, 2007).

## 4.2. Análise de conservação de domínios funcionais de TcSub2 através de modelagem molecular por homologia estrutural

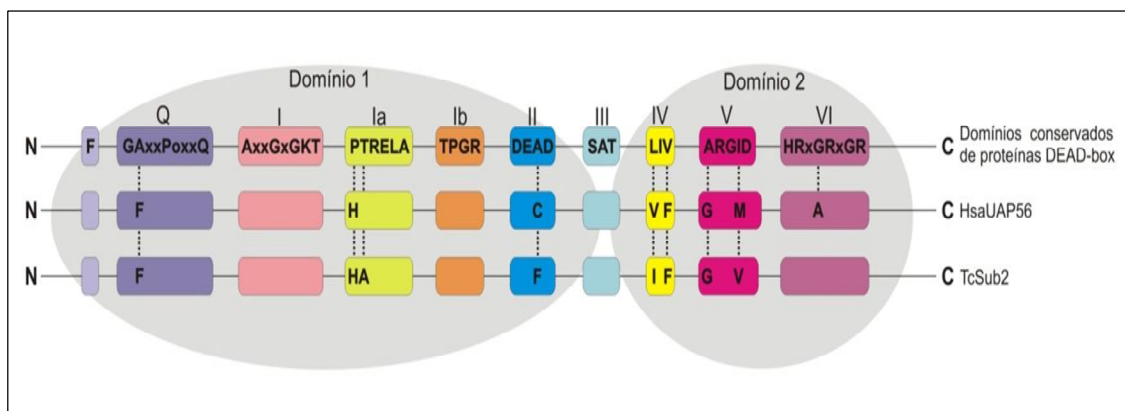
Após a confirmação de conservação de sequência de TcSub2 ao longo da filogenia de eucariotos, uma análise detalhada mostrou que os domínios funcionais estão altamente conservados quando comparados às ortólogas SceSub<sub>2</sub> e HsaUAP56. Essas proteínas estão incluídas em uma família de RNA helicases denominada DEXD/H-box, que possuem dois domínios: DEXDc e HELICc característicos, onde x é o aminoácido que pode variar dependendo da família de helicase. Os dados mostraram que TcSub2 possui os dois domínios característicos conservados, como pode ser observado na figura 21.



**Figura 21. Esquema representativo dos domínios da superfamília DEXDc-helicases.** Os domínios presentes nas proteínas estão ilustrados em vermelho, e os nomes das proteínas analisadas estão indicados do lado direito de cada ilustração. Fonte: NCBI *Conserved Domain Database and Search Service*, v2.16.

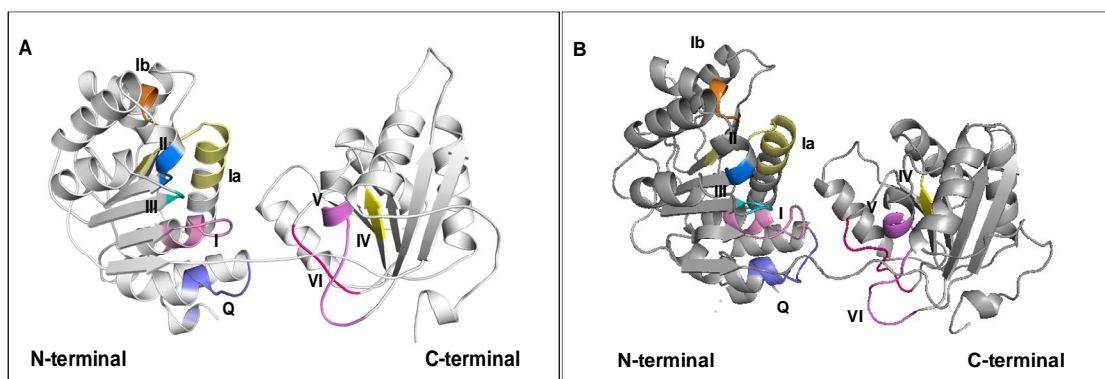
De modo geral, as proteínas DEAD-box helicases possuem 9 motivos conservados, responsáveis pela interação com RNAs e atividades ATPase. Foi observado que os motivos de TcSub2 apesar de conservados apresentaram alterações em alguns aminoácidos, como pode ser notado na figura 22.





**Figura 22. Análise de conservação de motivos da proteína TcSub2.** Na primeira linha estão ilustrados os motivos comuns entre proteínas DEAD-Box helicases: Q, I, Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, com a respectiva posição dos aminoácidos conservados. HsaUAP56 é a proteína ortóloga de SceSub<sub>2</sub> em humanos. TcSub2 é a proteína analisada de *T. cruzi*. Em cinza estão delimitados os dois domínios típicos de helicases. N: Porção N-terminal. C: Porção C-terminal. As linhas indicam os aminoácidos diferentes em relação aos existentes nos motivos comuns de proteínas DEAD-box.

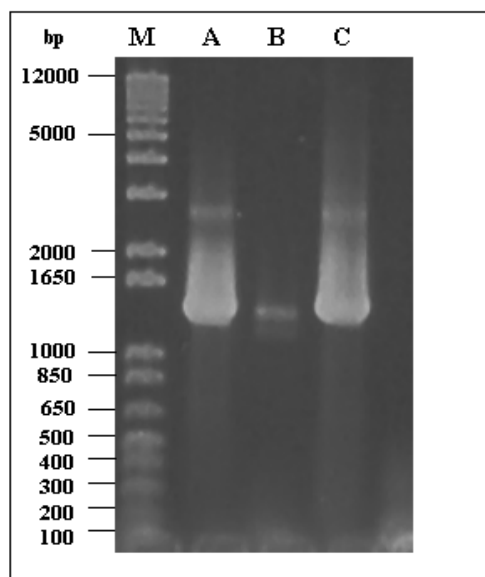
Resolvemos então avaliar se as alterações de aminoácidos poderiam interferir com a estrutura tridimensional dos motivos. Para tanto, como descrito no item 3.2., foi predita a estrutura tridimensional de TcSub2 baseando-se na estrutura cristalográfica da ortóloga HsaUAP56 presente no banco de estruturas do PDB (1XTK|A). Foi possível observar que os domínios e motivos estão estruturalmente conservados, similares aos de HsaUAP56, como ilustrado na figura 23.



**Figura 23. Estrutura terciária de TcSub2 e HsaUAP56.** A. Predição estrutural de TcSub2 baseada na estrutura cristalográfica de proteína humana HsaUAP56 depositada no banco PDB (pdb 1XTK|A). B. Estrutura terciária de proteína humana HsaUAP56 (pdb 1XTK|A). Os domínios estão em cinza e os motivos da proteínas estão indicados por cores. Para a predição estrutural foi utilizado o programa MODELLER versão 9v3 (SALI ; BLUNDELL, 1993).

#### 4.3. Caracterização funcional de TcSub2 por métodos de localização celular em *T. cruzi*.

Para avaliar a localização de TcSub2 foram utilizadas duas abordagens: a expressão em *T. cruzi* da proteína fusionada a GFP e a produção de antisoros policlonais para ensaios de imunofluorescência e imunocitoquímica a partir da inoculação em animais com a proteína recombinante. Como os vetores utilizados para fusão com GFP e para produção da proteína recombinante estão dentro da plataforma *Gateway*, o primeiro passo foi a amplificação da sequência correspondente à região codificante do gene TcSub2 por PCR e clonagem em vetor pDONR™221, conforme descrito no item 3.13.1. Após a transformação e seleção de bactérias resistentes à canamicina, alguns plasmídeos foram purificados e utilizados como molde para a verificação das clonagens de TcSub2 em vetor-pDONR™221 através de PCR. O resultado da verificação da clonagem pode ser observado na figura 24, onde o produto correspondente ao tamanho do gene de 1311 pares de bases foi amplificado.

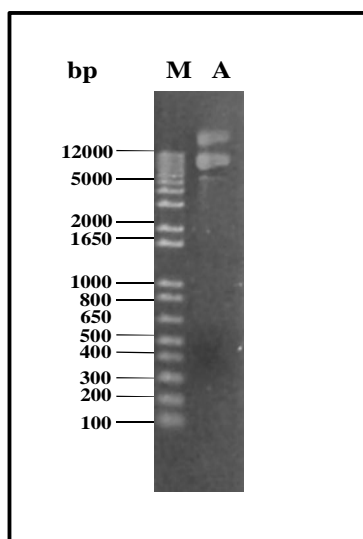


**Figura 24. Perfil eletroforético dos produtos de PCR para confirmação de clonagem de TcSub2 em vetor pDONR™221.** Gel de agarose 0,8% após coloração com solução de brometo de etídeo. M: marcador de massa molecular representado em pares de bases. A, B e C: Resultados da amplificação por de PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores de TcSub2.



Apesar de uma amplificação menos eficiente para o clone B (FIGURA 24), todos os plasmídeos foram utilizados para a confirmação da clonagem também por sequenciamento. O resultado mostrou que os três genes estavam corretamente clonados e por isso, foi escolhido de modo aleatório, o plasmídeo correspondente ao clone A (pDONR<sup>TM</sup>221-TcSub2) para a reação de recombinação com o vetor de destino pDEST<sup>TM</sup>17, para a produção da proteína recombinante, e o vetor pTcPR-GFPN para expressão de TcSub2 com fusão N-terminal de GFP.

Por uma questão didática, serão descritos primeiramente os resultados relativos à expressão da proteína recombinante e produção do antisoro, seguidos dos resultados sobre a fusão com GFP. As recombinações foram confirmadas por PCR e sequenciamento. O plasmídeo purificado correspondente ao clone pDEST-TcSub2 pode ser visualizado na figura 25.

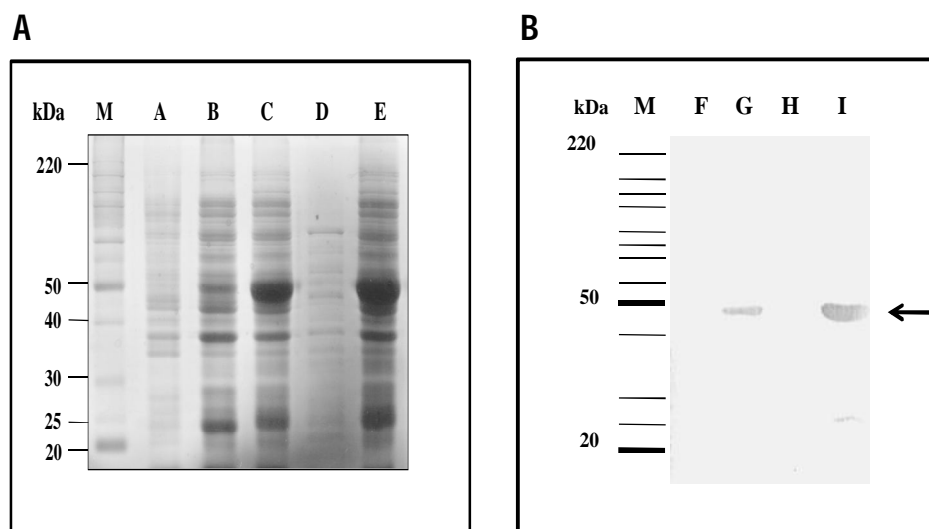


**Figura 25. Perfil eletroforético de minipreparação do plasmídeo correspondente ao clone pDEST<sup>TM</sup>17-TcSub2.** Gel de agarose 0,8% após coloração com solução de brometo de etídeo. M: Marcador de massa molecular representado em pares de bases. A: Minipreparação do clone pDEST<sup>TM</sup>17-TcSub2.

O plasmídeo pDEST<sup>TM</sup>17-TcSub2 foi utilizado para transformar *E. coli* cepa BL21 (DE3) pLysS cálcio-competente, como descrito no item 3.13.1. Após a transformação e seleção de bactérias resistentes à ampicilina, uma colônia isolada foi escolhida para a indução da expressão da proteína recombinante, conforme 3.13.1.1.

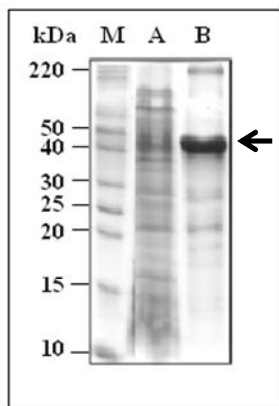
A indução foi analisada em gel SDS-PAGE e, conforme mostrado na figura 26 A, foi evidente a indução de uma proteína com massa molecular de

aproximadamente 49 kDa, compatível com o tamanho estimado da proteína recombinante TcSub2. Também foi observado que a proteína apresentou-se majoritariamente na fração insolúvel nestas condições de indução. Para a confirmação da expressão da proteína recombinante foi realizado também um ensaio de *Western blot*, conforme descrito no item 3.13.3.1, utilizando um anticorpo monoclonal anti-histidina. O resultado confirmou que a proteína induzida corresponde a TcSub2, pois a reatividade foi específica nas amostras induzidas (FIGURA 26 B).



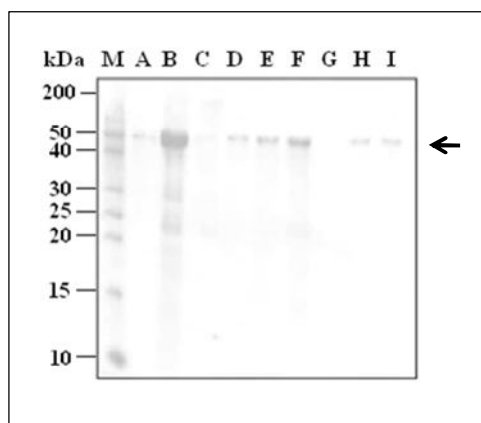
**Figura 26. Perfil eletroforético em gel SDS-PAGE 10 % de indução da proteína recombinante TcSub2 e teste de solubilidade** M: Marcador de massa molecular representado em kDa - *Benchmark* (Invitrogen). A: Extrato protéico total *E. coli* BL21 (DE3) *wild-type*. B: Extrato protéico total não induzido. C: Extrato protéico total de bactéria induzido. D: Extrato protéico da fração solúvel induzido. E: Extrato protéico da fração insolúvel induzido. F: *Western blot* anti-histidina de extrato protéico total não induzido. G: *Western blot* anti-histidina de extrato protéico total induzido. H: *Western blot* anti-histidina de extrato protéico da fração solúvel induzido. I: *Western blot* anti-histidina de extrato protéico da fração insolúvel induzido.

Anterior à etapa de purificação, foi padronizado o enriquecimento da proteína recombinante TcSub2 na fração insolúvel do extrato protéico. Foi induzido 200 mL de cultura de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS transformada com o clone pDEST<sup>TM</sup>17-TcSub2 com IPTG como descrito em 3.13.1.2. Esta etapa de enriquecimento consistiu em lavagens com tampão de purificação para minimizar proteínas contaminantes da amostra no processo final. O resultado do enriquecimento foi eficiente e pode ser observado na figura 27.



**Figura 27. Perfil eletroforético em gel SDS-PAGE 15% de fração insolúvel enriquecida com a proteína recombinante TcSub2.** M: Marcador de massa molecular representado em kDa - *Benchmark* (Invitrogen). A: Extrato protéico total proveniente de cultura não induzida. B: Teste de enriquecimento da proteína recombinante TcSub2 na fração insolúvel de cultura induzida.

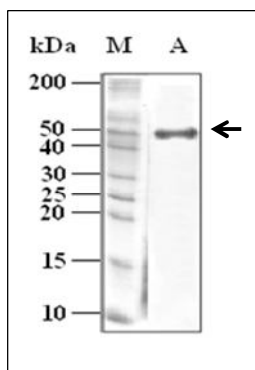
Uma vez padronizado o protocolo de enriquecimento da proteína TcSub2 recombinante, foi realizada então a purificação. A fração insolúvel do extrato protéico foi enriquecida e submetida à cromatografia de afinidade com resina de Ni-NTA, (ver item 3.13.1.2). O processo de purificação foi avaliado por gel SDS-PAGE e o resultado está mostrado na figura 28.



**Figura 28. Perfil eletroforético em gel SDS-PAGE 15% das frações obtidas através de cromatografia em resina de níquel.** M: Marcador de massa molecular representado em kDa - *Benchmark* (Invitrogen). A: Lavado 1. B: Tampão A pH 8,0. C: Tampão B pH 8,0. D: Tampão C pH 6,3. E: Tampão D pH 5,9. F: Tampão E pH 4,5. G: Tampão F pH 4,0. H: Tampão G pH 3,5. I: Tampão H pH 3,0.

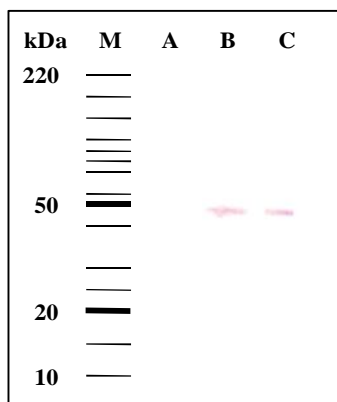
Infelizmente o processo de purificação através de resina de Ni-NTA não foi eficiente, pois ocorreu a eluição da proteína recombinante TcSub2 em quase todas as frações. Por isso, foi realizada a purificação em gel preparativo após a mistura de

todas as frações eluídas na etapa da resina de níquel, como descrito no item 3.13.1.2. Após a retirada da fração do gel correspondente a proteína, esta foi eletroeluída em tampão para SDS-PAGE. Esta etapa foi eficiente e o resultado desta purificação pode ser observado na figura 29.



**Figura 29. Perfil eletroforético em gel SDS-PAGE 15% de proteína recombinante TcSub2 eletroeluída.** M: Marcador de massa molecular representado em kDa - *Benchmark* (Invitrogen). A: Proteína TcSub2 eletroeluída de gel preparativo.

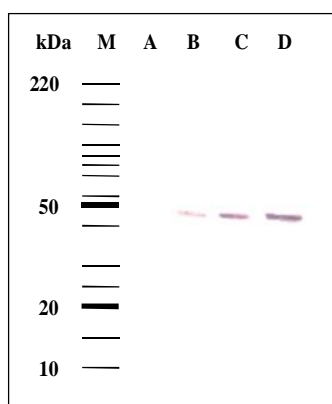
A proteína recombinante TcSub2 purificada foi utilizada como antígeno para produção de antisoro policlonal em camundongos e coelhos conforme item 3.13.2. Os antisoros de camundongos foram testados quanto à especificidade de reconhecimento da proteína TcSub2 em extrato protéico de *T. cruzi* em fase exponencial de crescimento através de ensaio de *Western blot* revelado por fosfatase alcalina como descrito no item 3.13.3.1. O resultado pode ser visualizado na figura 30.



**Figura 30. Análise por *Western blot* para teste de especificidade do antisoro de camundongo anti-TcSub2 em extratos protéicos de *T. cruzi*.** -  $5 \times 10^6$  células/canal em gel SDS-PAGE 15%. M: Marcador de massa molecular representado em kDa - *Benchmark* (Invitrogen). A: Diluição do antisoro de camundongo pré-imune 1:600. B: Diluição do antisoro de camundongo imune 1:600. C: Diluição do antisoro de camundongo imune 1:1200.

Este resultado confirmou a especificidade do reconhecimento do antisoro produzido por camundongo, visto que o antisoro pré-imune não reconheceu proteínas do extrato protéico de *T. cruzi* (canal A), enquanto o antisoro imune reconheceu apenas uma proteína de massa molecular esperada de 49 kDa nas diferentes diluições do antisoro (canais B e C).

Como este mesmo antisoro primário seria usado posteriormente para análises de RNAi, foi testada sua especificidade para o reconhecimento da proteína altamente similar, TbSub2, em extrato protéico total de *T. brucei* através de ensaio de *Western blot*, conforme descrito no item 3.13.3.1. Os resultados podem ser observados na figura 31.

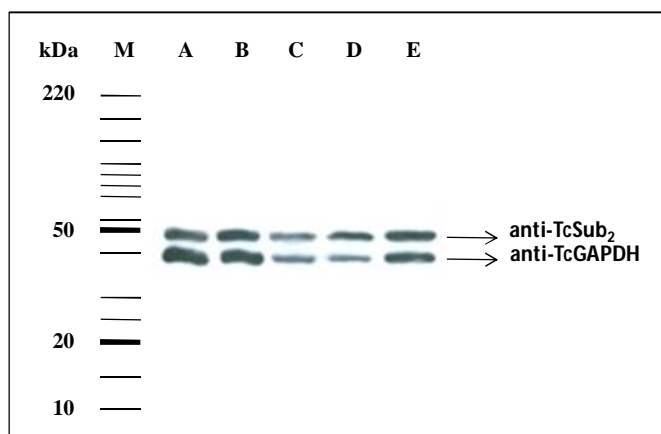


**Figura 31. Análise por *Western blot* para teste de especificidade do antisoro de camundongo anti-TcSub2 em extratos protéicos de *T. brucei*.**  $5 \times 10^6$  células/canal em gel SDS-PAGE 15%. M: Marcador de massa molecular representado em kDa - *Benchmark* (Invitrogen). A: Diluição de antisoro de camundongo pré-imune 1:75. B: Diluição do antisoro de camundongo imune 1:300. C: Diluição do antisoro de camundongo imune 1:150. D: Diluição do antisoro imune 1:75.

Este resultado confirmou a especificidade do reconhecimento do antisoro produzido para também em *T. brucei*, visto que o antisoro pré-imune não reconheceu proteínas do extrato protéico (canal A), enquanto o antisoro imune reconheceu apenas a proteína de massa molecular de 49 kDa em diferentes diluições do antisoro (canais B, C e D).

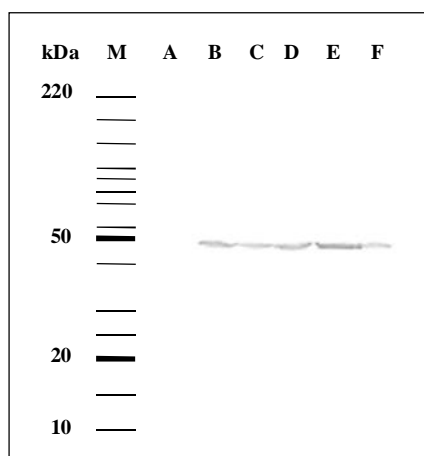
Este antisoro produzido em camundongo também foi utilizado na análise da expressão da proteína TcSub2 ao longo da metaciclogênese de *T. cruzi*, através de *Western blot*, descrito em 3.13.3.2, em extratos protéicos das diferentes etapas do ciclo celular.

Neste caso, foi utilizada a diluição de 1:600 e o antisoro policlonal  $\alpha$ -TcGAPDH foi utilizado na diluição de 1:200 como controle de integridade do extrato protéico. O resultado deste ensaio pode ser observado na figura 32, mostrando que a proteína TcSub2 está presente em todas as etapas do ciclo de vida de *T. cruzi* e não parece ser regulada em nível de expressão de proteína .



**Figura 32. Análise por *Western blot* para verificação do perfil da proteína TcSub2 ao longo da metaciclogênese de *T. cruzi*.** A diluição do antisoro de camundongo imune anti-TcSub2 utilizada foi de 1:600. Gel SDS-PAGE 10% contendo extrato protéico de *T. cruzi* -  $5 \times 10^6$  células/canal. M: Marcador de massa molecular representado em kDa - *Benchmark* (Invitrogen). A: Extrato protéico de formas epimastigotas em fase exponencial de crescimento. B: Extrato protéico de formas epimastigotas após 2 horas de estresse nutricional. C: Extrato protéico de formas aderidas após 24 horas de estresse nutricional. D: Extrato protéico de formas tripomastigotas metacíclicas. E: Extrato protéico de formas amastigotas.

O antisoro produzido em coelho também foi testado em diferentes diluições quanto à especificidade de reconhecimento da proteína TcSub2 em extrato protéico de *T. cruzi* em fase de crescimento exponencial de crescimento através de ensaio de *Western blot*, como descrito no item 3.13.3.1. O resultado pode ser visualizado na figura 33.

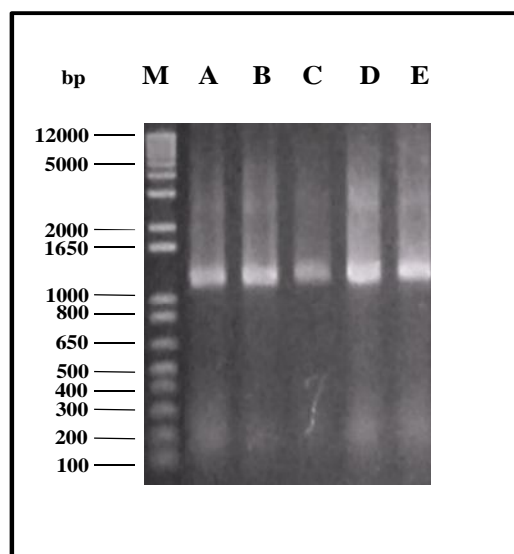


**Figura 33. Análise por *Western blot* para teste de especificidade do antisoro de coelho anti-TcSub2 em extratos protéicos de *T. cruzi*.** Extratos protéicos de *T. cruzi* -  $5 \times 10^6$  células por canal em gel SDS-PAGE 15 %. M: Marcador de massa molecular representado em kDa - *Benchmark* (Invitrogen). A: Diluição de antisoro de coelho pré-imune 1:100. B: Diluição de antisoro de coelho imune 1:100. C: Diluição de antisoro de coelho imune 1:200. D: Diluição de antisoro de coelho imune 1:500. E: Diluição de antisoro de coelho imune 1:1000. F: Diluição de antisoro de coelho imune 1:2000.

Da mesma forma que o antisoro de camundongo, este antisoro produzido em coelho apresentou especificidade à proteína TcSub2 visto que o antisoro pré-imune não reconheceu proteínas do extrato protéico (canal A) enquanto o antisoro imune reconheceu apenas a proteína de massa molecular de 49 kDa nas diferentes diluições do antisoro (canais de B a F). Este antisoro foi utilizado então para os ensaios de localização celular desta proteína no parasita através de imunofluorescência.

#### 4.3.1 TcSub2 é uma proteína exclusivamente nuclear

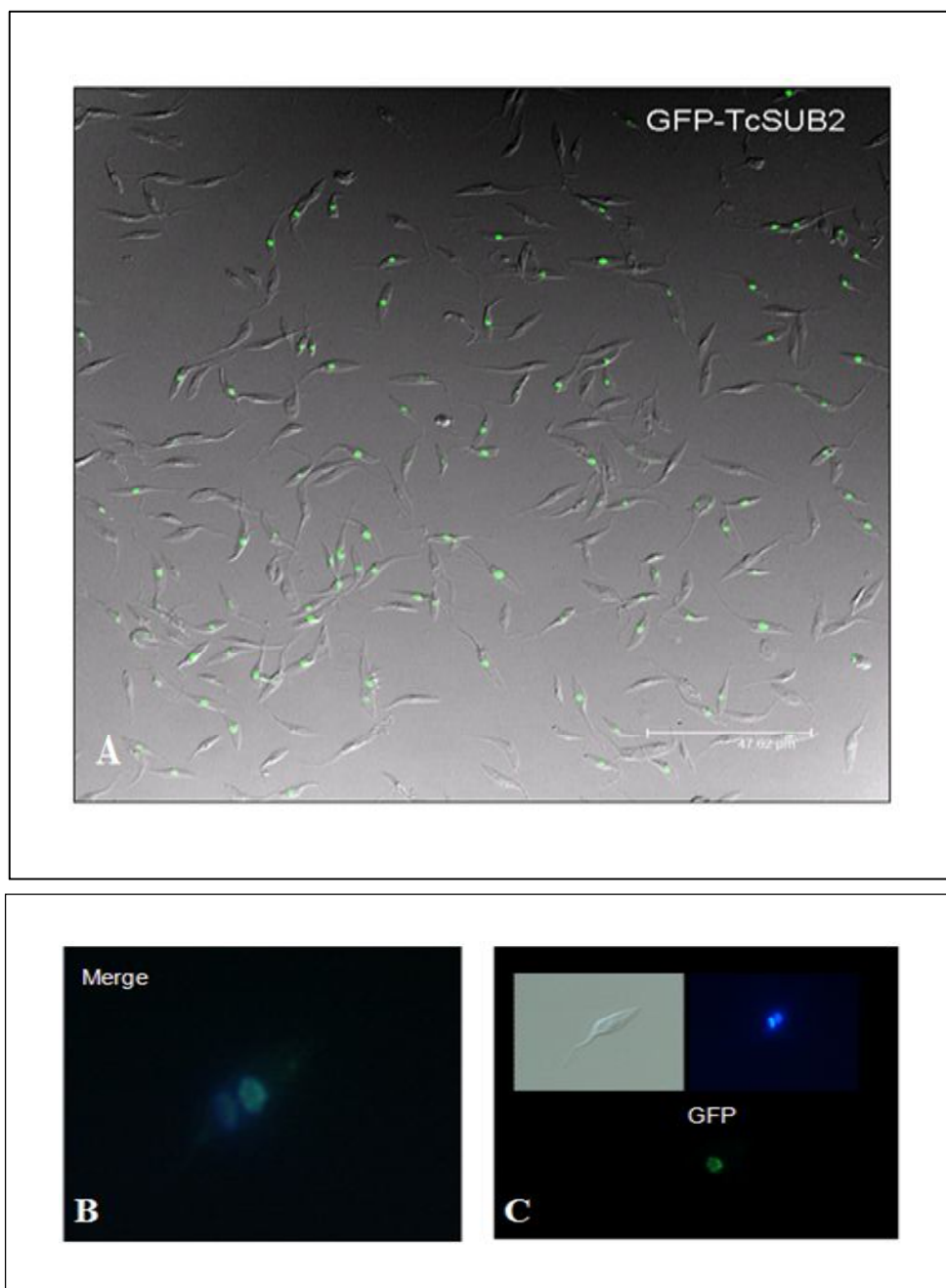
Os dados iniciais de localização foram obtidos *in vivo*, utilizando o sistema baseado em vetor para expressão da proteína fusionada à GFP N-terminal, conforme item 3.13.4. Estes dados foram obtidos enquanto os antisoros estavam sendo produzidos. A recombinação do clone pDNOR-TcSub2 com o vetor pTcPR-GFPN foi confirmada por PCR de colônia e o resultado de amplificação do gene de TcSub2 pode ser observado na figura 34.



**Figura 34. Perfil eletroforético da análise de clonagem do gene TcSub2 em vetor pTcPR-GFPN por PCR de colônia.** Gel de agarose 0,8% após coloração com solução de brometo de etídeo. M: marcador de massa molecular demonstrado em pares de bases. A,B,C,D,E: Resultados positivos de amplificação por PCR do gene TcSub2.

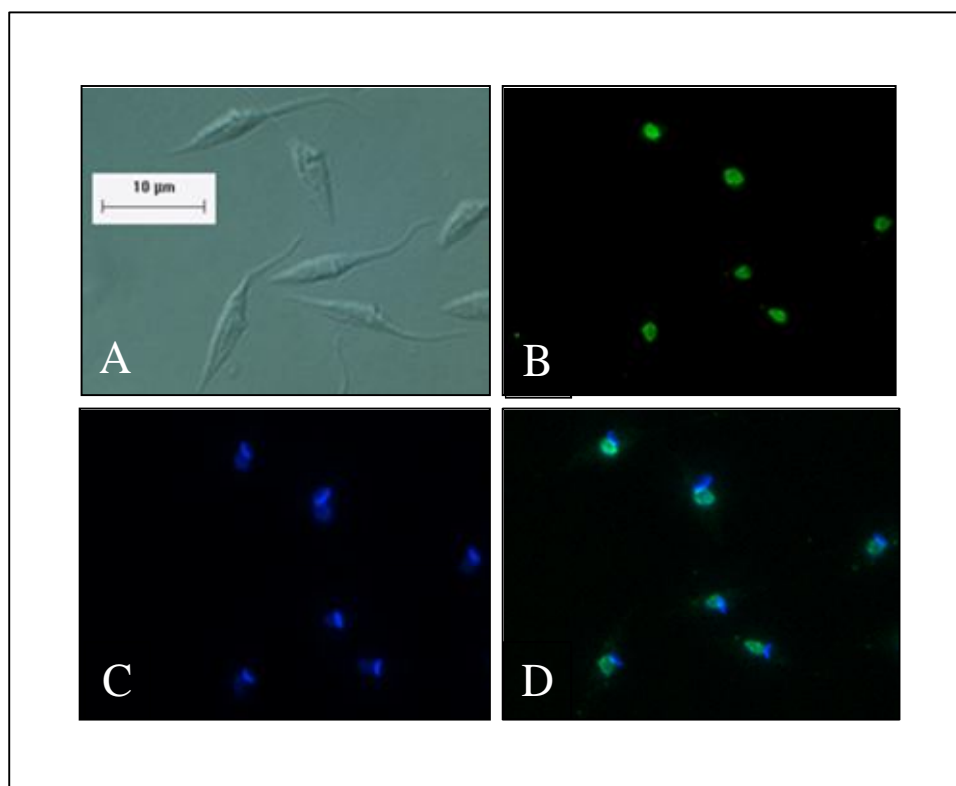
Após a verificação da clonagem, os plasmídeos foram purificados e sequenciados. O plasmídeo referente ao clone correto pTcPR-GFPN-TcSub2 foi utilizado para transfecção de *T. cruzi* e após a seleção dos transfectantes por G418, foi possível observar a localização subcelular da proteína TcSub2. Foi observado que a proteína TcSub2 é exclusivamente nuclear e parece apresentar uma distribuição compartimentalizada, como exposto com detalhes na figura 35.





**Figura 35. Localização nuclear de TcSub2 fusionada a GFP em vetor pTcPR-GFPN-TcSub2 de superexpressão em *T. cruzi*.** DIC: contraste interferencial. Em verde: Fluorescência de proteína GFP capturada com excitação em comprimento de onda de 488 nm. Em azul: Sinal emitido pelo DAPI capturado com excitação em comprimento de onda de 372 nm. A: Microscopia confocal de parasitas transfectados com pTcPR-GFPN-TcSub2, mostrando sobreposição de imagem em DIC (corpo do parasita) com visualização de fluorescência nuclear de GFP. B: Sobreposição de imagens dos parasitas transfectados com TcNGFP-TcSub2 através de microscopia fluorescência de DAPI e GFP. C: Imagens separadas de contraste interferencial (DIC), marcação de cromatina nuclear e de cinetoplasto (DAPI) e fluorescência de GFP através de microscopia de parasitas transfectados com pTcPR-GFPN-TcSub2.

A localização nuclear de TcSub2, bem como o padrão de compartimentalização desta proteína no núcleo de *T. cruzi*, foram confirmados através de ensaios de imunofluorescência utilizando os antisoros de coelho específico à proteína TcSub2. As lâminas foram preparadas e observadas em microscopia ótica de fluorescência. O resultado pode ser observado na figura 36.

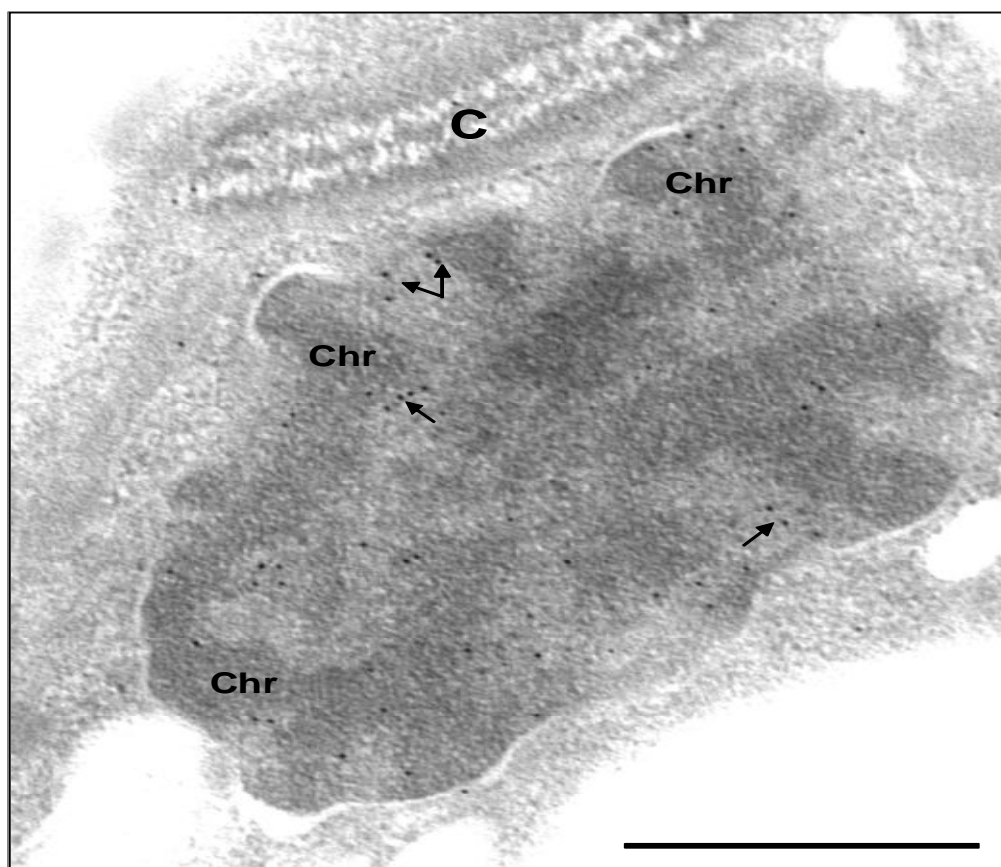


**Figura 36. Localização nuclear da proteína TcSub2 em *T. cruzi* por imunofluorescência através de microscopia ótica de fluorescência.** Em verde: TcSub2, fluorescência capturada após excitação em comprimento de onda de 488 nm. Em azul: DNA, sinal de DAPI capturado após excitação em comprimento de onda de 372 nm. A. Imagem capturada por contraste interferencial ( DIC). B: Imunofluorescência utilizando antisoro primário anti-TcSub2 produzido em coelho diluição 1:1000 seguido de antisoro secundário modificado com Alexa 488. C. Marcação da cromatina nuclear e de cinetoplasto através de DAPI. D. Sobreposição dos resultados obtidos em B e C.

#### 4.3.2 TcSub2 está associada a sítios de transcrição de mRNA

Visto que TcSub2 é uma proteína nuclear e que em outros organismos faz a ligação entre transcrição e exportação, foram realizados ensaios de imunocitoquímica para uma análise ultraestrutural quanto à distribuição desta

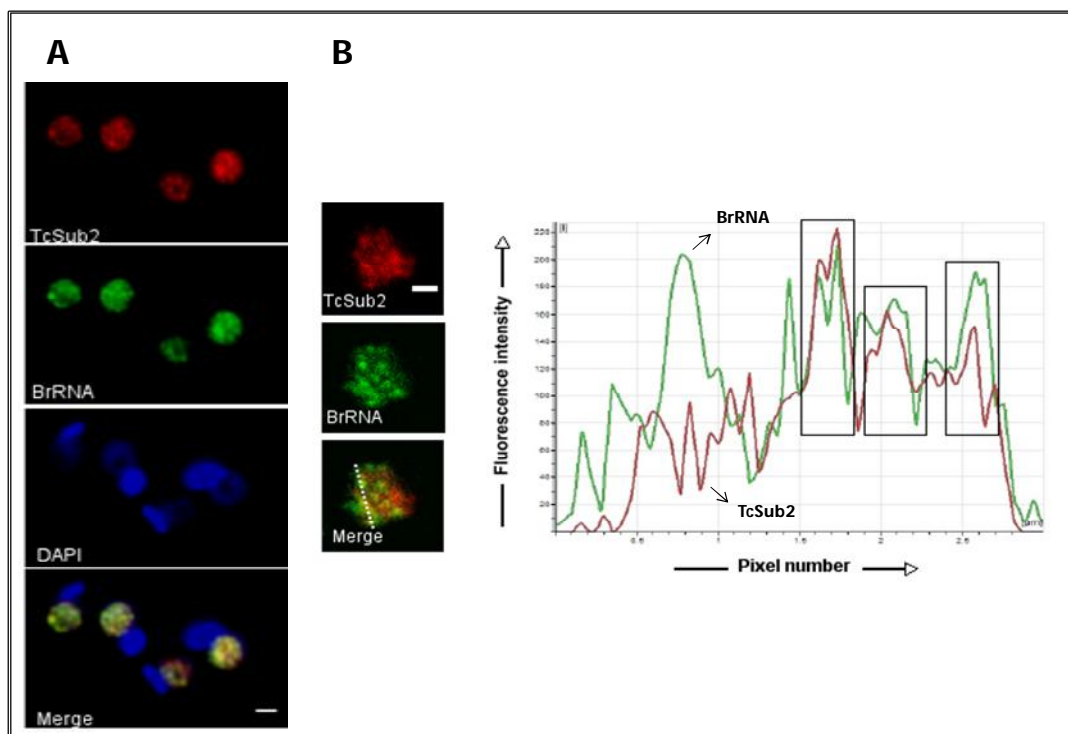
proteína no núcleo de *T. cruzi* com relação à cromatina. Os resultados mostraram que esta proteína está presente principalmente em regiões pouco eletrodensas que correspondem à cromatina menos compacta. Além disso, foi notado que a maioria da marcação ocorre na borda de regiões eletrodensas, ou seja, bordas de massas de cromatina compactadas, como destacado na figura 37.



**Figura 37. Análise de distribuição nuclear de TcSub2 em *T. cruzi* por imunocitoquímica ultraestrutural.** C: Cinetoplasto. Chr: Massas de cromatina eletrodensas. As setas indicam localizações de TcSub2 nas bordas de cromatinas eletrodensas. Barra: 1 µm.

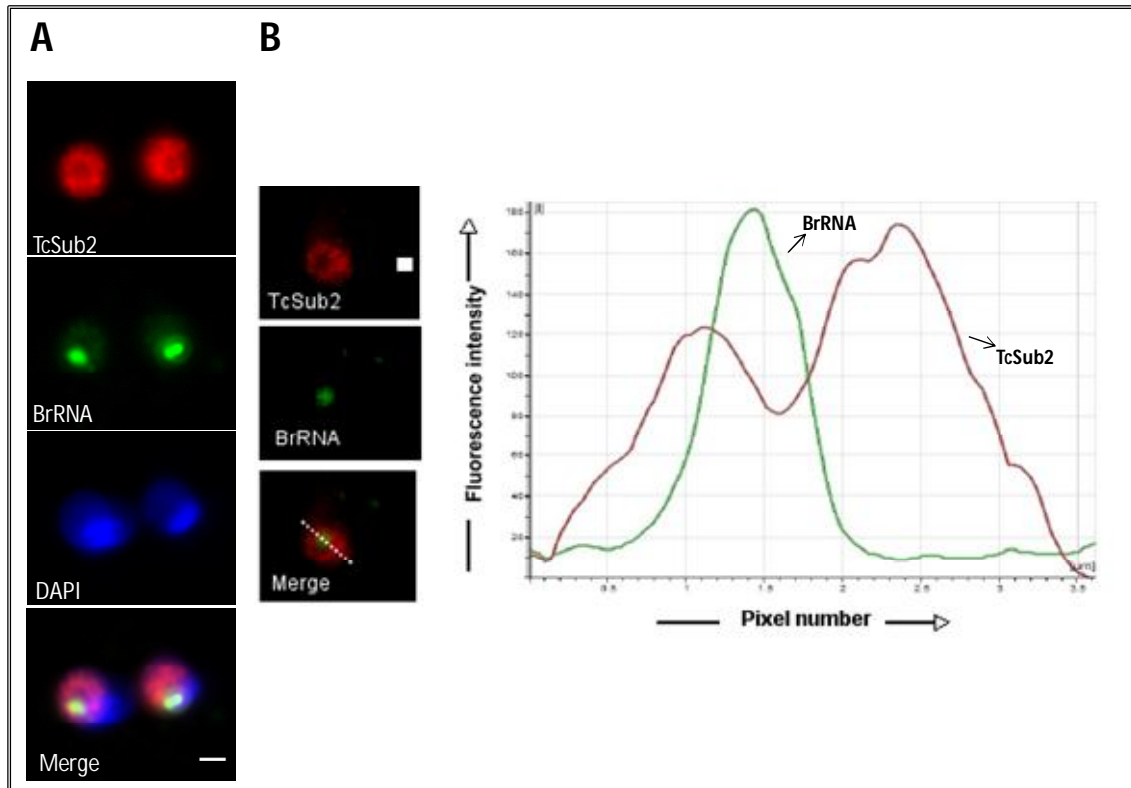
Nesta região de bordas de cromatina eletrodensa está presente a cromatina menos compacta e é o local onde geralmente há transcrição ativa (VERSCHURE *et al.*,1999). Este fato foi um indício de que TcSub2 estaria associada a sítios ativos de transcrição e para testar esta hipótese foi usada uma abordagem de transcrição *in vitro* com incorporação de BrUTP, como descrito no item 3.13.5.1. Neste caso, os RNAs nascentes que incorporaram BrUTP foram detectados com antisoro comercial seguido da imunodeteção com antisoro específico para a proteína TcSub2. Este ensaio foi analisado através de microscopia ótica de fluorescência e a colocalização

foi avaliada através de microscopia confocal. O resultado apresentado na figura 38 A observado em microscopia de fluorescência mostrou que a proteína TcSub2 colocaliza com regiões de RNAs nascentes, ou seja, parece estar associada a sítios de transcrição ativa. No entanto, a análise detalhada com microscopia confocal revelou que este padrão não ocorre para todos os sítios de transcrição. Como pode ser visto na figura 38 B, ao ser delimitada uma região para a avaliação por gráfico da intensidade da fluorescência para cada marcação, foi possível verificar que existem regiões com marcação para RNA nascente sem que ocorra marcação para TcSub2. Este padrão de colocalização parcial é constante em diferentes planos focais. Algumas fatias óticas em diferentes planos focais foram anexadas para a visualização da colocalização entre alguns sítios de transcrição ativa com TcSub2 (FIGURAS 1 e 2, Anexo 3 - Mídia).



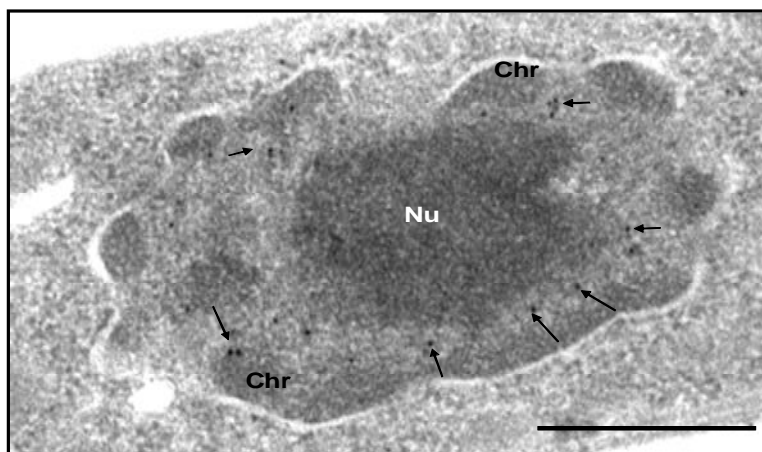
**Figura 38. Análise nuclear de colocalização da proteína TcSub2 com sítios ativos de transcrição através de detecção de RNAs nascentes em *T. cruzi*.** A: Visualização de colocalização por microscopia de fluorescência. TcSub2: Imunolocalização da proteína TcSub2. BrRNA: Imunolocalização da RNAs nascentes. DAPI: Marcação de cromatina. Merge: Sobreposição das três imagens superiores. B: Análise de colocalização por microscopia confocal através de intensidades de fluorescência. Para esta análise foi feito um traço pontilhado sobre o resultado de sobreposição das imagens de TcSub2 (vermelho) e RNAs nascentes-BrRNA (verde). O gráfico mostra os perfis de intensidade fluorescência de TcSub2 (vermelho) e BrRNA (verde) ao longo do espaço delimitado dentro do núcleo pelo traço pontilhado. Os quadrados em preto indicam as regiões de perfis similares entre os picos de intensidades de fluorescência de TcSub2 e RNAs nascentes, indicando colocalização. Barra: 1  $\mu$ m. Para esta análise em microscopia confocal foi utilizado zoom 8.00.

Para avaliar a especificidade da marcação com BrUTP, as células foram previamente tratadas com 200 µg/mL de  $\alpha$ -amanitina, concentração que permite apenas a transcrição por RNA Polimerase I e inibe a ação da RNA Polimerase II e III. Foi realizado um ensaio para bloquear apenas RNA Polimerase II utilizando a concentração de 75 µg/mL e foi observado o mesmo padrão de marcação, havendo um sítio visível de transcrição por RNA Polimerase I. Nestas condições não foi observada marcação em outras regiões que corresponderiam transcrição por RNA Polimerase III (dados não mostrados). Isto se deve ao fato de o protocolo utilizado ser otimizado para marcação de transcrição por RNA Polimerase II. Como pode ser observado na figura 39, a marcação com BrUTP praticamente desapareceu após o tratamento com  $\alpha$ -amanitina e aparentemente TcSub2 está associada basicamente a transcrição com RNA pol II, ou seja, RNA mensageiro visto que não foi observado sobreposição de marcação entre sítios de RNA pol I e TcSub2. Isto também sugere que a proteína não estaria associada a sítios de transcrição de rRNA. Vale ressaltar que este tipo de resultado foi reprodutível, mas escolhemos apenas uma imagem para elaborar a figura. Algumas fatias óticas em diferentes planos focais foram anexadas para a visualização da colocalização entre alguns sítios de transcrição ativa com TcSub2 (FIGURAS 3 e 4, Anexo 3 - Mídia).



**Figura 39. Análise nuclear de colocalização da proteína TcSub2 com sítios ativos de transcrição de RNA Polimerase I através de detecção de RNAs nascentes em *T. cruzi*.** A: Visualização de colocalização por microscopia de fluorescência. TcSub2: Imunolocalização da proteína TcSub2. BrRNA: Imunolocalização da RNAs nascentes por transcrição através de RNA Polimerase I. DAPI: Marcação de cromatina. Merge: Sobreposição das três imagens superiores. B: Análise de colocalização através de intensidades de fluorescência. Para esta análise foi feito um traço pontilhado sobre o resultado de sobreposição das imagens de TcSub2 (vermelho) e BrRNA (verde). O gráfico mostra os perfis de intensidade de fluorescência de TcSub2 (vermelho) e BrRNA (verde) ao longo do espaço delimitado dentro do núcleo pelo traço pontilhado. Barra: 1  $\mu$ m. Para esta análise em microscopia confocal foi utilizado o zoom: 5.00.

A exclusão de localização da proteína com sítios de transcrição de RNA polimerase I observada pelos ensaios de microscopia ótica foram corroborados pelas análises de imunocitoquímica que comprovaram a ausência de TcSub2 no nucléolo, como mostrado na figura 40. Neste caso, foi observada apenas marcação nas regiões de cromatina menos compacta.



**Figura 40. Análise nuclear de ausência de TcSub2 em nucléolo de *T. cruzi* por imunocitoquímica ultraestrutural.** C: Cinetoplasto. Chr: Massas de cromatina eletrodensas. Nu: Nucléolo. As setas indicam localizações de TcSub2. Barra: 1  $\mu$ m.

Os resultados descritos até o momento mostram que TcSub2 está associada basicamente a sítios de transcrição de mRNA sem envolvimento direto com sítios de transcrição de rRNA. No entanto, ainda é necessário ser demonstrado o quanto isto reflete a sua função na exportação de mRNA em *T. cruzi*.

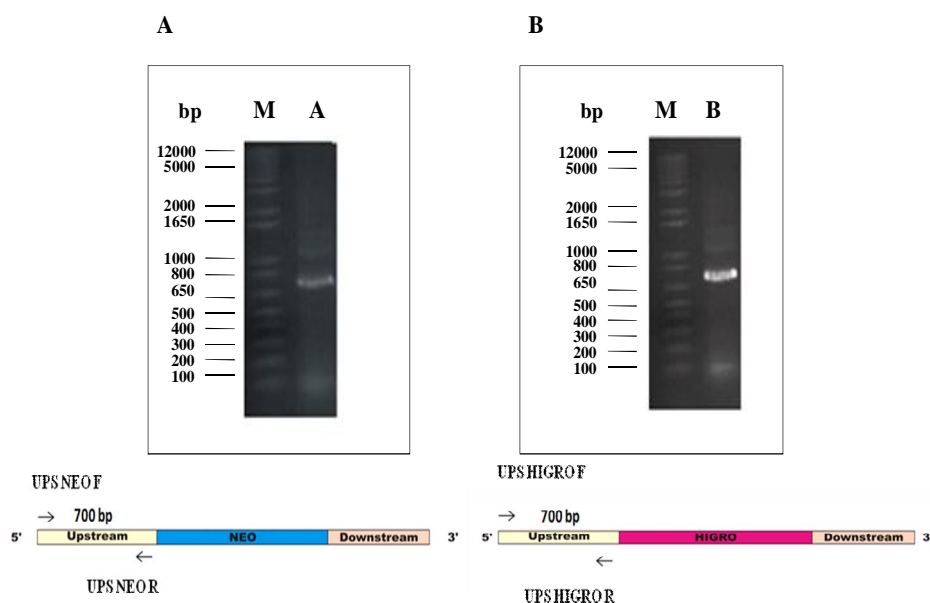
#### **4.4. Avaliação de viabilidade de manipulação por nocaute gênico de TcSub2**

Para realizarmos abordagens que visam a análise genética para avaliar o quanto TcSub2 está participando da exportação de mRNA foi necessário gerar mutantes do parasita que não possuam a proteína. Neste caso, como o gene TcSub2 está presente em cópia única no genoma de *T. cruzi*, a primeira tentativa referiu-se a obtenção de linhagens cujos alelos de TcSub2 estivessem nocauteados. Para tanto, oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados com base nas regiões intergênicas, conforme descrito no item 3.14.1, que foram utilizados para amplificar as regiões a serem clonadas visando a obtenção das construções necessárias para a substituição dos alelos de TcSub2 por genes de marcadores seletivos através de recombinação homóloga.

#### 4.4.1. Clonagem de regiões intergênicas de TcSub2 em vetores pBS-NEO e pBS-HIGRO

##### 4.4.1.1. Amplificação da região *upstream* de TcSub2 para clonagem em vetor pBS-NEO e pBS-HIGRO

Primeiramente foram amplificadas regiões intergênicas que flanqueavam o gene TcSub2. O resultado da amplificação das regiões *upstream* a TcSub2, tanto para clonagem em vetor pBS-NEO quanto em pBS-HIGRO, itens 3.14.1.1 e 3.14.1.3, pode ser visualizado na figura 41.

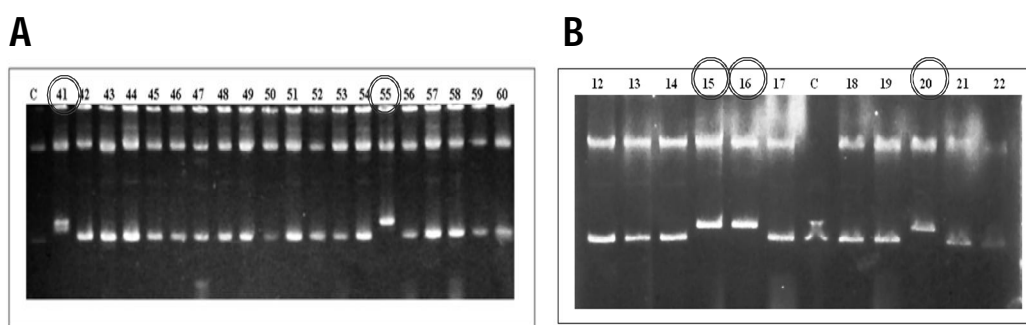


**Figura 41. Perfil eletroforético dos produtos de PCR de regiões intergênicas *upstream* de TcSub2 para clonagem em vetores pBS-NEO e pBS-HIGRO.** Gel de agarose 0,8% após coloração com solução de brometo de etídeo. M: Marcador de massa molecular demonstrado em pares de bases. A: Resultado de amplificação por PCR da região intergênica *upstream* para clonagem em vetor pBS-NEO. B: Resultado de amplificação por PCR da região intergênica *upstream* para clonagem em vetor pBS-HIGRO. Abaixo consta esquema da construção a ser obtida e os iniciadores utilizados estão esquematizados.



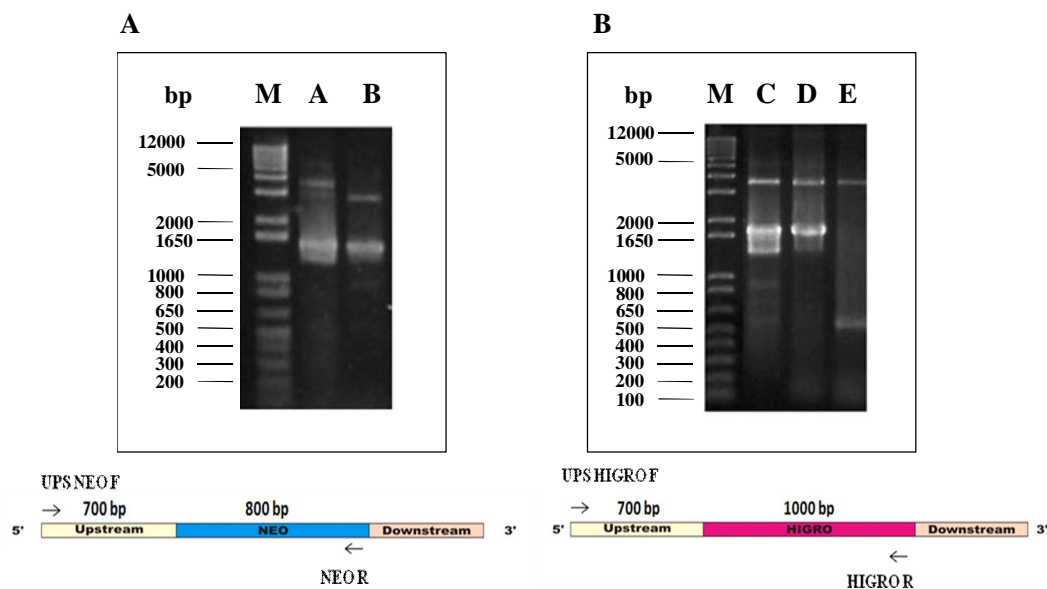
#### 4.4.1.1.1. Clonagem de região *upstream* de TcSub2 em vetor pBS-NEO e pBS-HIGRO

Os produtos de PCR referentes à região *upstream* de TcSub2 (FIGURA 41 A e B) foram digeridos, purificados e clonados em vetor pBS-NEO e pBS-HIGRO, respectivamente. O resultado da análise de colônias para seleção do clones positivos pode ser observado na figura 42.



**Figura 42. Perfil eletroforético do vetor pBS-NEO E pBS-HIGRO após processamento pelo método de palitagem das colônias de bactérias DH5 $\alpha$  transformadas com as respectivas ligações. Gel de agarose 0,8% corado em solução de brometo de etídeo. A: Análise de bactérias transformadas com ligação pBS-NEO/UPS. B. Análise de bactérias transformadas com ligação pBS-HIGRO/UPS C: Controle vetor pBS-NEO à esquerda e pBS-HIGRO à direita. Em destaque as colônias posteriormente analisadas.**

Os plasmídeos purificados referentes às colônias 41 e 55 (FIGURA 42 A) e às colônias 15,16 e 20 (FIGURA 42 B) foram posteriormente analisados por PCR para confirmação da inserção do produto de PCR na orientação correta, conforme itens 3.14.1.1 e 3.14.1.3. A massa molecular dos produtos de PCR foram de acordo com o esperado e o resultado pode ser observado na figura 43.

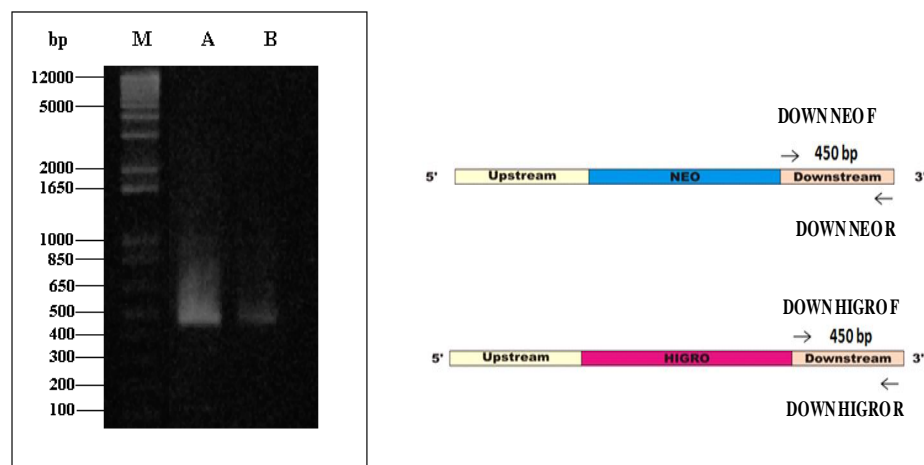


**Figura 43. Perfil eletroforético da análise de clonagem de região intergênica *upstream* de TcSub2 em vetor pBS-NEO e pBS-HIGRO por PCR.** Gel de agarose 0,8% após coloração com solução de brometo de etídeo. M: Marcador de massa molecular demonstrado em pares de bases. A: A, B - Resultado de amplificação por PCR referentes às colônias 41 e 55, respectivamente. B: C, D, E - Resultado de amplificação por PCR referentes às colônias 15, 16 e 20, respectivamente. Os iniciadores utilizados estão esquematizados na figura, bem como os tamanhos de cada fragmento analisado.

Após a verificação das clonagens na orientação correta, o plasmídeo do clone referente à colônia 41 (FIGURA 42 A) foi denominado pBS-UPS-NEO e o plasmídeo do clone referente à colônia 15 (FIGURA 42 B) foi denominado pBS-UPS-HIGRO. Ambos foram sequenciados e após a confirmação do dado, foram utilizados para finalizar a construção com região *downstream* de TcSub2.

#### 4.4.1.2. Amplificação da região *downstream* de TcSub2

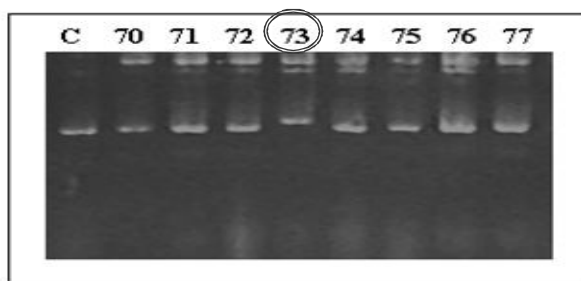
Os resultados da amplificação referentes a região *downstream* para clonagem tanto em pBS-UPS-NEO quanto em pBS-UPS-HIGRO, podem ser visualizados na figura 44.



**Figura 44. Perfil eletroforético dos produtos de PCR de regiões intergênicas *downstream* de TcSub2 para clonagem em vetores pBS-UPS-NEO e pBS-UPS-HIGRO.** Gel de agarose 0,8 % após coloração com solução de brometo de etídeo. M: Marcador de massa molecular demonstrado em pares de bases. A: Resultado de amplificação por PCR da região intergênica *downstream* para clonagem em vetor pBS-UPS-NEO. B: Resultado de amplificação por PCR da região intergênica *downstream* para clonagem em vetor pBS-UPS-HIGRO. Os iniciadores utilizados estão esquematizados na figura.

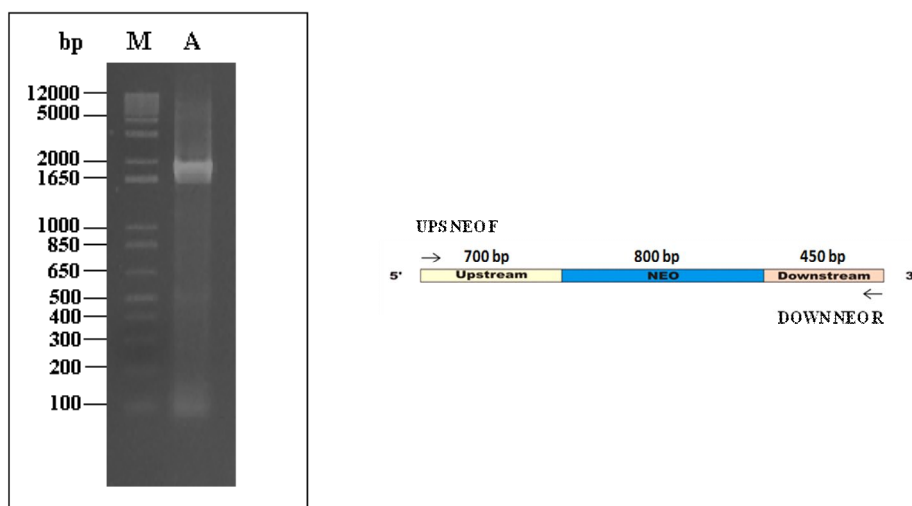
#### 4.4.1.2.1. Clonagem da região *downstream* de TcSub2 nos vetores pBS-UPS-NEO e pBS-UPS-HIGRO

O produto de PCR (FIGURA 44 A) correspondente à região intergênica *downstream*-NEO e o clone pBS-UPS-NEO foram digeridos e purificados como descrito no item 3.14.1.2. A reação de ligação foi utilizada para transformar bactérias e a análise dos clones positivos foi feita através do método da palitagem e o resultado está representado na figura 45.



**Figura 45. Perfil eletroforético do vetor pBS-NEO após processamento pelo método de palitagem das colônias de bactérias DH5 $\alpha$  transformadas com ligação pBS-UPS-NEO/DOWN.** Gel de agarose 0,8 % após coloração em solução de brometo de etídeo. C: Controle pBS-UPS-NEO clone 41. 70 a 77: Colônias analisadas. Em destaque a colônia posteriormente analisada.

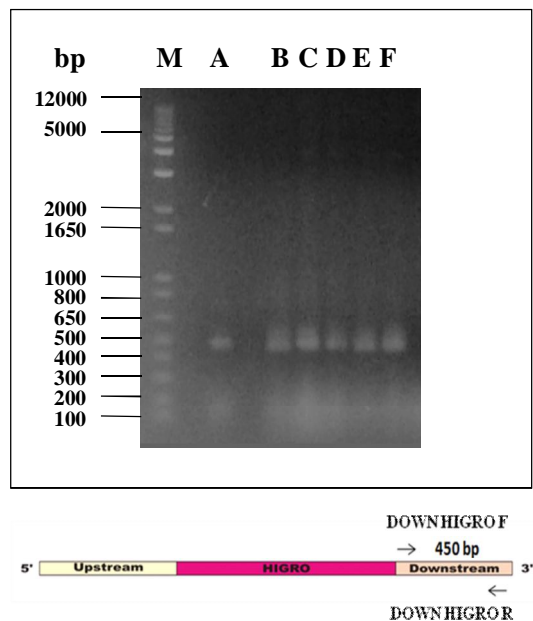
O plasmídeo referente ao clone positivo (colônia número 73) foi purificado e analisado por PCR para confirmar a inserção na orientação correta, conforme descrito no item 3.14.1.2. A massa molecular do produto de PCR estava de acordo com o esperado e o clone foi denominado de pBS-UPS-NEO-DOWN. O resultado pode ser observado na figura 46.



**Figura 46. Perfil eletroforético da análise de clonagem das regiões intergênicas *upstream* e *downstream* de TcSub2 flangeadoras do gene de NEO, por PCR.** Gel de agarose 0,8 % após coloração com solução de brometo de etídeo. M: Marcador de massa molecular demonstrado em pares de bases. A: Resultado de PCR do clone pBS-UPS-NEO-DOWN. Os iniciadores utilizados estão esquematizados na figura.

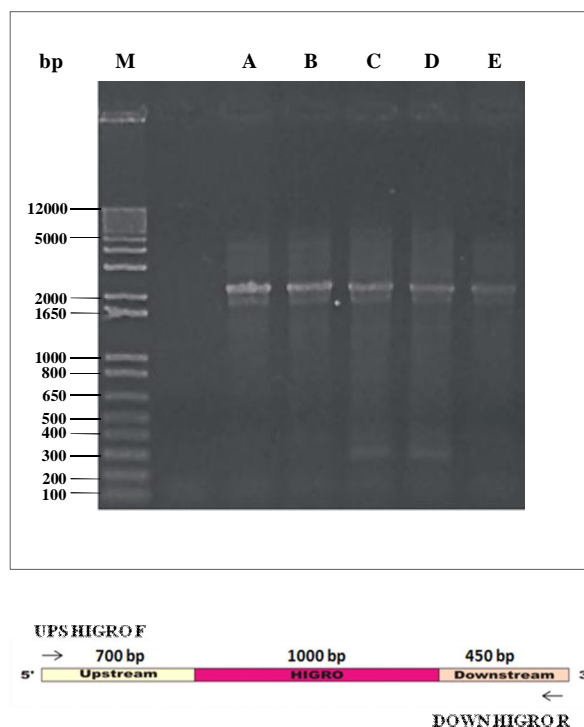
O resultado do produto de PCR (FIGURA 44 B), referente à região intergênica *downstream* de TcSub2 foi posteriormente digerido e purificado, assim como o clone selecionado pBS-UPS-HIGRO (FIGURA 43 B), conforme citado no item 3.14.1.4. A reação de ligação foi utilizada para transformar bactérias e as colônias isoladas

foram analisadas por PCR, conforme descrito no item 3.14.1.4. A massa molecular do produto de PCR foi de acordo com o esperado e o resultado pode ser observado na figura 47.



**Figura 47. Perfil eletroforético da análise de clonagem da região intergênica *downstream* de TcSub2 em clone pBS-UPS-HIGRO por PCR de colônia.** Gel de agarose 0,8 % após coloração com solução de brometo de etídeo. M: Marcador de peso molecular demonstrado em pares de bases. A: Resultado de amplificação por PCR da região *downstream* de TcSub2 utilizado como controle positivo de clonagem. B,C,D e F: Resultado de amplificação por PCR de colônia da região *downstream* de TcSub2 dos possíveis clones. Os iniciadores utilizados estão esquematizados na figura.

Os plasmídeos dos clones positivos foram purificados e analisados por PCR para verificação de clonagem na orientação correta, conforme descrito no item 3.14.1.4. A massa molecular do produto de PCR estava de acordo com o esperado e os clones foram denominados de pBS-UPS-HIGRO-DOWN. O resultado pode ser observado na figura 48.



**Figura 48. Perfil eletroforético da análise de clonagem das regiões intergênicas *upstream* e *downstream* de TcSub2 flanqueadoras do gene de HIGRO, por PCR.** Gel de agarose a 0,8% após coloração com solução de brometo de etídeo. M: Marcador de massa molecular demonstrado em pares de bases. A. Resultado de amplificação por PCR de plasmídeos purificados. Os iniciadores utilizados estão esquematizados na figura.

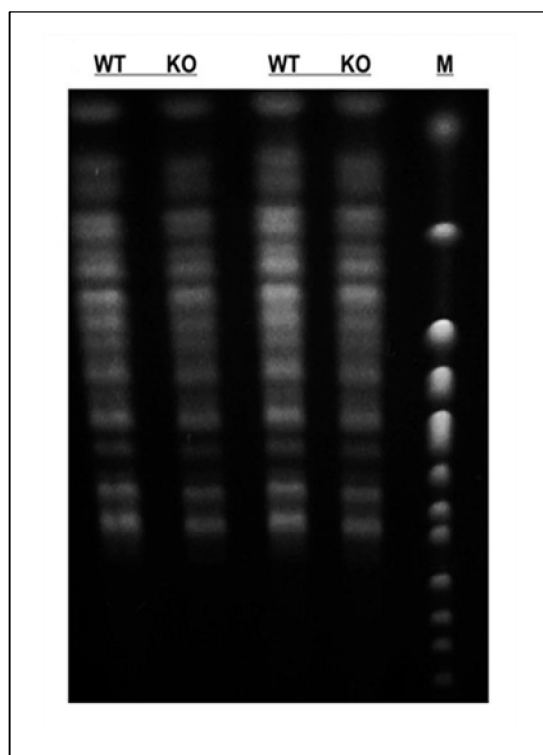
Ambas as construções foram analisadas também por sequenciamento confirmando a clonagem correta.

Para os ensaios de transfecção, fragmentos de DNA correspondentes ao gene de resistência NEO e HIGRO flanqueado pelas regiões *upstream* e *downstream* de TcSub2 foram então amplificados por PCR e purificados por eletroeluição. O fragmento purificado foi utilizado para transfecção em *T. cruzi*, conforme item 3.12.1.

Primeiramente foi nocauteado um alelo do gene TcSub2 utilizando o fragmento purificado referente ao gene de resistência à NEO, flanqueado pelas regiões intergênicas de TcSub2. Uma vez selecionada a população, os parasitas foram clonados por diluição limitante e posteriormente foi verificado o nocaute gênico na população clonal por *Southern blot*.

#### 4.4.2. Verificação do Nocaute de um alelo do gene TcSub2 através de substituição por gene de resistência à Neomicina

Após a seleção dos parasitas, foi realizada eletroforese em campo pulsado seguida de análises tipo *Southern blot* para confirmação da substituição de um alelo de TcSub2 pelo gene de resistência à neomicina. O experimento foi realizado em duplicata, contendo amostras dos parasitas *Wild-type* (WT) e dos transfectantes (KO). A figura 49 mostra o resultado da separação de cromossomos das amostras analisadas por eletroforese em campo de pulsos alternados.



**Figura 49. Perfil eletroforético de Campo Pulsado em gel de agarose 1,2 % após coloração com solução de brometo de etídeo.** M: Marcador 345 Yeast Chromosome PFG Marker, de 225 a 1900 Kb (NEB). WT: *T. cruzi* Wild-type. KO: *T. cruzi* com um alelo nocauteado pela substituição de TcSub2 por gene de resistência à neomicina.

O DNA foi transferido para membrana de náilon e incubado com sondas radioativas correspondentes ao gene TcSub2 e ao gene de resistência a neomicina para confirmação do nocaute de um alelo. A primeira dupla WT-KO foi incubada apenas com a sonda correspondente ao gene TcSub2 enquanto a segunda apenas com a sonda correspondente ao gene de neomicina e a figura 50 mostra o resultado

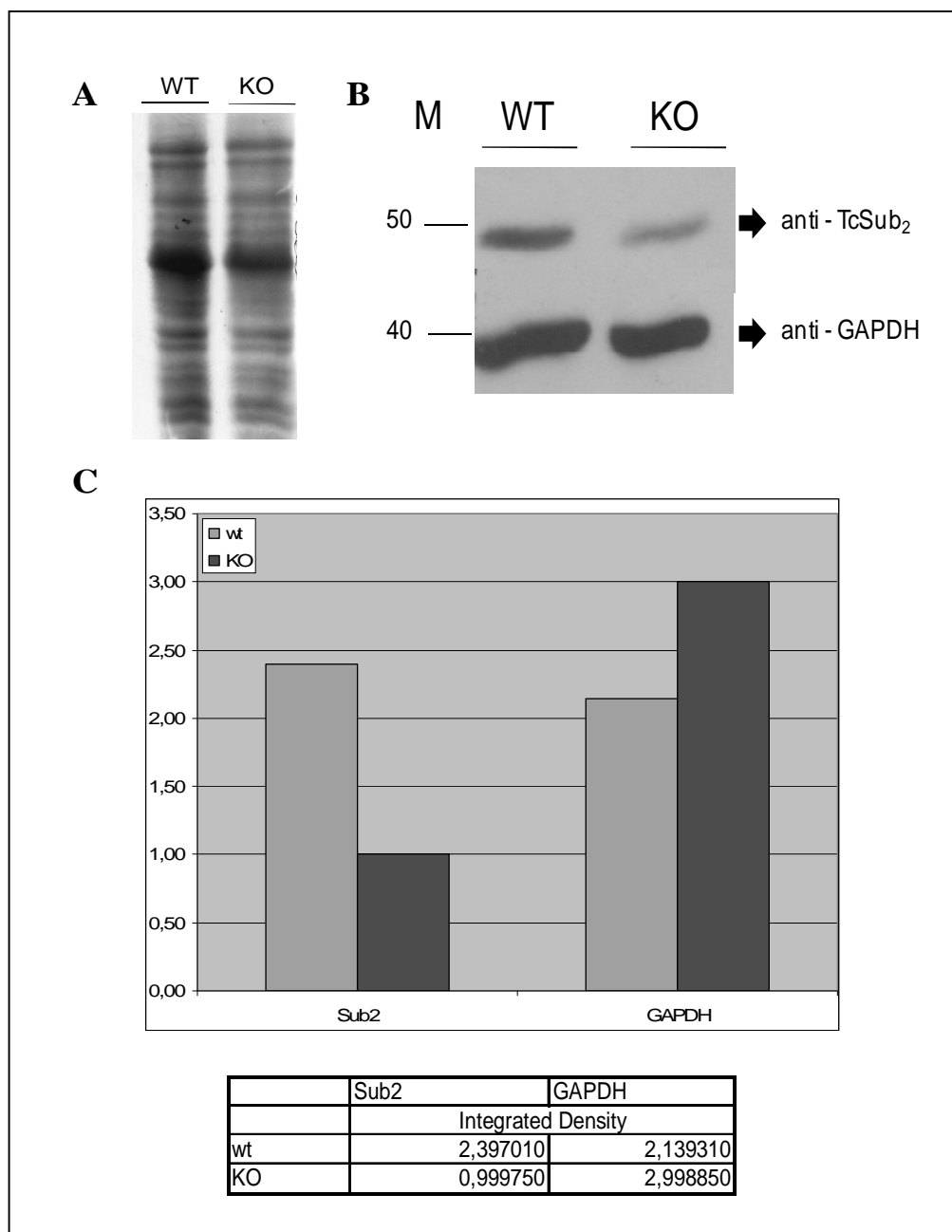
da hibridação. Quando utilizada a sonda TcSub2, a marcação de dois alelos foi observada apenas na população WT, já na população nocaute apenas um alelo de TcSub2 foi detectado. Nas amostras hibridadas com a sonda correspondente ao gene NEO, nenhuma marcação foi observada na população selvagem, ao contrário da população nocaute onde ocorreu uma marcação na região que corresponderia ao alelo de TcSub2. Sendo assim, foi possível confirmar que um alelo de TcSub2 foi substituído pelo gene de neomicina (NEO).



**Figura 50. Ensaio de Hibridação por *Southern blot*.** WT: *T. cruzi* Wild-type. KO: *T. cruzi* com um alelo nocauteado pela substituição de TcSub2 por gene de resistência a neomicina. O quadrado destaca a ausência de um alelo de TcSub2 à esquerda e a presença do gene de resistência a neomicina à direita.

Além de confirmar o nocaute de um dos alelos, foi possível verificar que isto causou a diminuição na expressão da proteína através de análises de *Western blot*, conforme descrito no item 3.14.1.5. Neste caso, o simples nocaute foi suficiente para diminuir o nível de expressão da proteína TcSub2 em aproximadamente 50% quando comparada ao nível de TcGAPDH, utilizada como referência para esta análise. Os resultados podem ser observados nas figuras 51 B e 51 C.

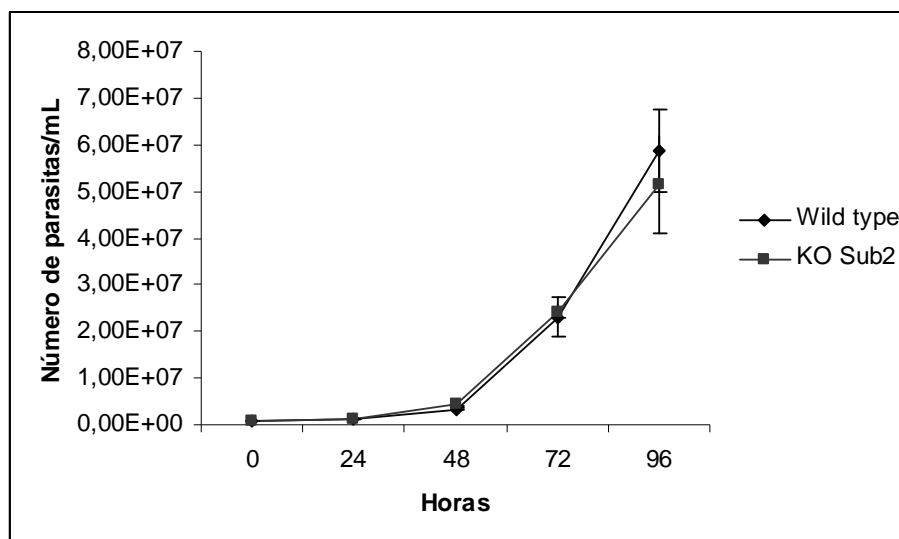




**Figura 51. Quantificação da expressão de proteína TcSub2 em população clonal de *T. cruzi* simples nocaute (KO).** A: Gel de poliacrilamida SDS-PAGE corado após eletroforese. WT: Extrato protéico de população *Wild-type*. KO: Extrato protéico de população com um alelo de TcSub2 nocauteado. Em cada canal foi aplicada a quantidade de proteína referente a  $5 \times 10^6$  parasitas. B. *Western blot* do gel da figura A, revelado por quimioluminescência. O marcador está representado do lado esquerdo em kDa. C. Resultado da quantificação do *Western blot* pelo programa Scion Image.

Para avaliar se a diminuição da quantidade de proteína TcSub2 poderia interferir com o crescimento dos parasitas ou gerar alguma alteração na morfologia, foi realizada uma curva de crescimento dos parasitas WT e KO, conforme descrito

no item 3.12.1. Durante a fase exponencial de crescimento dos parasitas, foi possível observar se existia alguma alteração fenotípica assim como obter a concentração de células para gerar a curva de crescimento. Como mostrado na figura 52, nenhuma diferença significativa foi observada quanto à capacidade de divisão celular assim como nenhuma alteração na morfologia quando comparadas as populações selvagem e nocaute. Sendo assim, podemos concluir que pelo menos no que se refere à capacidade de divisão celular, a diminuição em 50% do nível de TcSub2 não teve qualquer efeito.



**Figura 52. Curva de crescimento de *T. cruzi* Wild type e nocaute (KO Sub2) durante a fase exponencial de crescimento.** Eixo y: Número de parasitas por mL. Eixo x: Intervalos em horas para a realização da contagem dos parasitas.

Após a confirmação do nocaute simples, a população clonal foi então transfectada com o fragmento purificado referente ao gene de resistência à higromicina flanqueado pelas regiões intergênicas. Os parasitas não apresentaram crescimento e a transfecção foi realizada novamente, para eliminar erros técnicos, mas não foi possível obter o nocaute duplo do gene TcSub2, o que indica ser um gene essencial à sobrevivência de *T. cruzi*.

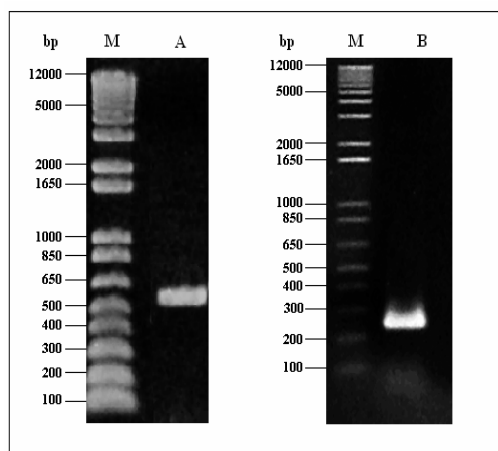
Devido à inviabilidade de obtenção do nocaute duplo, uma alternativa que utilizamos foi a obtenção de linhagens de *T. brucei* mutantes para silenciamento do gene TbSub2, que codifica para uma proteína ortóloga de *T. cruzi*. Este sistema apresenta vantagens em relação ao nocaute por ser induzido e permitir visualização

de fenótipo a partir da ausência da proteína nos parasitas antes da morte das células.

#### 4.5. Obtenção de transfectantes de *T. brucei* para ensaios de interferência de RNA

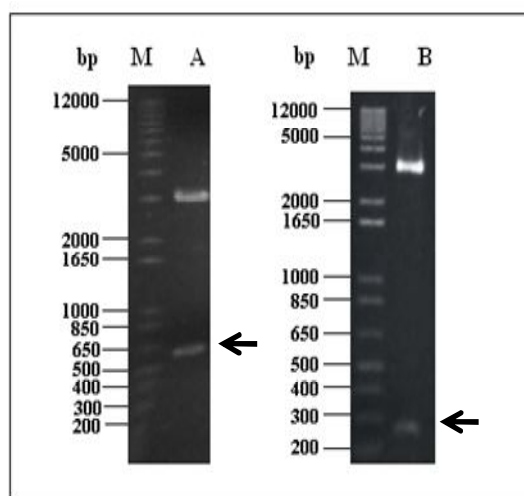
Em virtude da alta probabilidade do nocaute duplo não ser viável e da alta similaridade entre as sequências dos genes de *T. brucei* e *T. cruzi*, resolvemos obter linhagens de *T. brucei* para realização de ensaios de “knockdown” e avaliação fenotípica. Pretendemos utilizar estas linhagens para analisar o quanto o silenciamento do gene afetaria a exportação de mRNA. Logo, o gene ortólogo em *T. brucei* (Tb10.70.7730) foi escolhido como alvo neste estudo para o silenciamento através de interferência de RNA (RNAi).

Como estratégia para garantir o silenciamento do mRNA alvo, escolhemos duas regiões (denominadas TbSub2A e TbSub2B) para clonagem no vetor de produção de RNA dupla fita. As amplificações de TbSub2A e TbSub2B foram executadas conforme descrito no item 3.14.2 e podem ser visualizadas na figura 53.



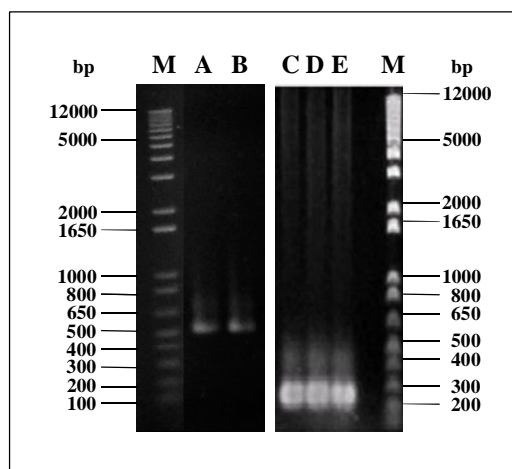
**Figura 53. Perfil eletroforético dos produtos de PCR dos fragmentos TbSub2A e TbSub2B para subclonagem em vetor pGEM-Teasy.** Gel de agarose 0,8% após coloração com solução de brometo de etídeo. M: Marcador de massa molecular demonstrado em pares de bases. A: Resultado de amplificação da região TbSub2A. B: Resultado de amplificação da região TbSub2B.

Os produtos de PCR foram clonados no vetor pGEM-Teasy e algumas colônias brancas foram escolhidas para analisar a eficiência da clonagem através da digestão dos plasmídeos purificados. Os resultados das digestões dos clones de pGEM-TbSub2A e pGEM-TbSub2B podem ser visualizados na figura 54, confirmando a liberação dos insertos com os tamanhos corretos.



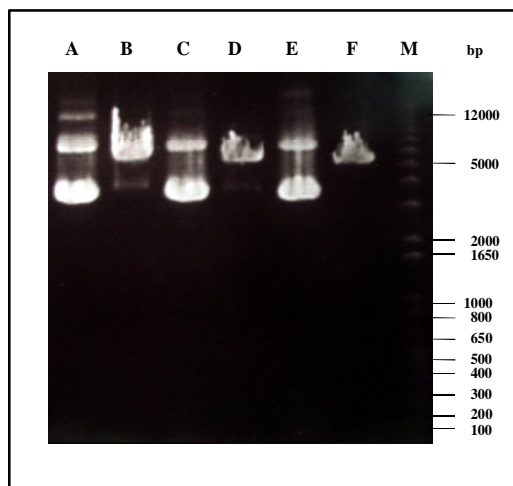
**Figura 54. Perfil eletroforético de digestão dos clones pGEM-TbSub2A e pGEM-TbSub2B.** Gel de agarose 0,8% após coloração em solução de brometo de etídeo M: Marcador de massa demonstrado em pares de bases. A: Resultado de digestão do clone de pGEM-TbSub2A com enzimas *Bam*HI e *Xho*I. B: Resultado de digestão do clone pGEM-TbSub2B com as enzimas *Hind*III e *Bam*HI. Ambos os clones liberaram os fragmentos no tamanho correto.

Após a confirmação da clonagem por sequenciamento, os insertos foram purificados e clonados em vetor p2T7-177, conforme descrito no item 3.14.2. Para a verificação da clonagem neste vetor, as colônias foram analisadas por PCR e o resultado dos clones positivos pode ser visualizado na figura 55.



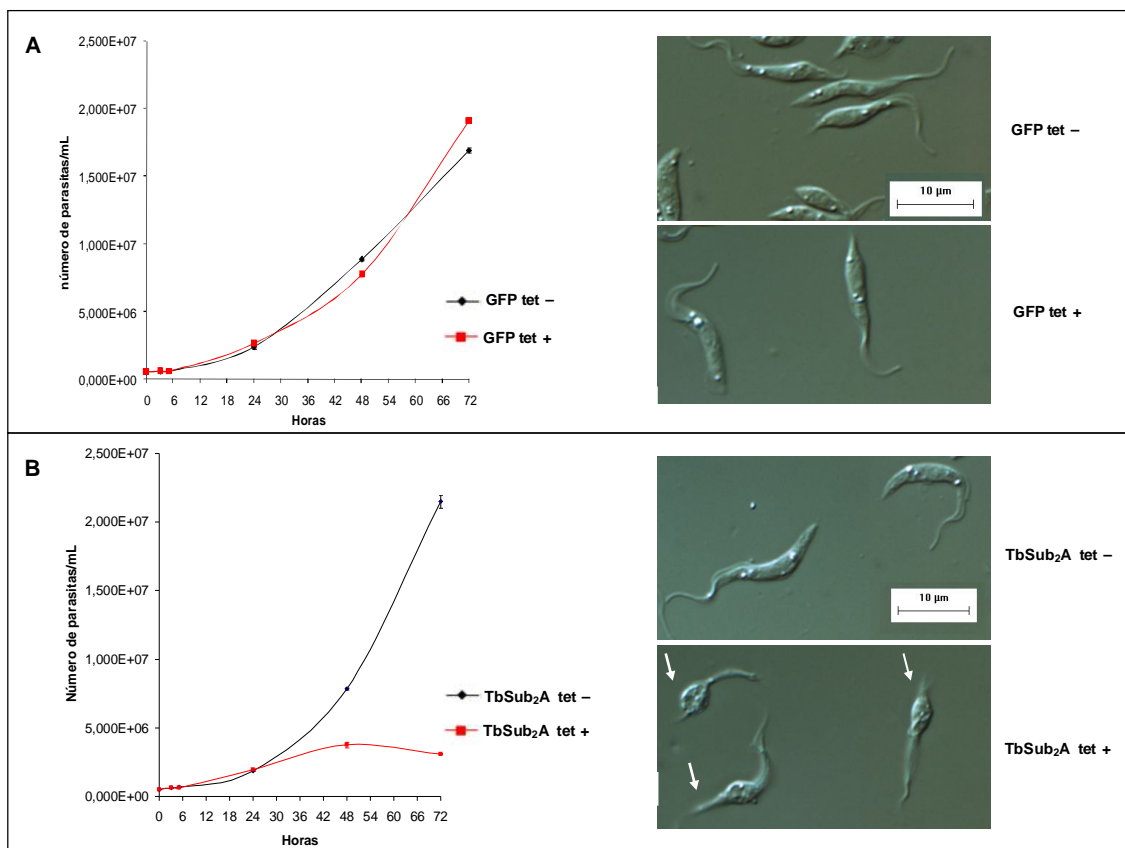
**Figura 55. Perfil eletroforético da análise de clonagem dos fragmentos TbSub2A e TbSub2B em vetor p2T7-177 por PCR de colônia.** Gel de agarose 0,8 % após coloração com solução de brometo de etídeo. M: Marcador de massa molecular demonstrado em pares de bases. A,B: Resultado de PCR de colônia transformada com ligação p2T7-177/TbSub2A. C,D,E: Resultado de PCR de colônia transformada com ligação p2T7-177/TbSub2B.

Após a clonagem em vetor p2T7-177, os plasmídeos foram purificados, sequenciados e denominados p2t7-177-TbSub2A e p2t7-177-TbSub2B. Os vetores p2t7-177-TbSub2A, p2t7-177-TbSub2B, bem como o vetor p2t7-177-GFP utilizado para o controle, foram linearizados com *NotI* para posterior transfecção de *T. brucei*. Este material digerido e que foi utilizado para transfecção pode ser visualizado na figura 56.



**Figura 56. Perfil eletroforético de p2T7-177-GFP e clones p2T7-177-TbSub2A e P2T7-177-TbSub2B, com as respectivas digestão por *NotI*.** Gel de agarose 0,8% após coloração em solução de brometo de etídeo. M: Marcador de massa molecular demonstrado em pares de bases. A: p2T7-177-GFP. B: p2T7-177-GFP digerido com *NotI*. C: p2T7-177-TbSub2A. D: P2T7-177-TbSub2A digerido com *NotI*. E: p2T7-177TbSub2B. F: P2T7-177-TbSub2B digerido com *NotI*.

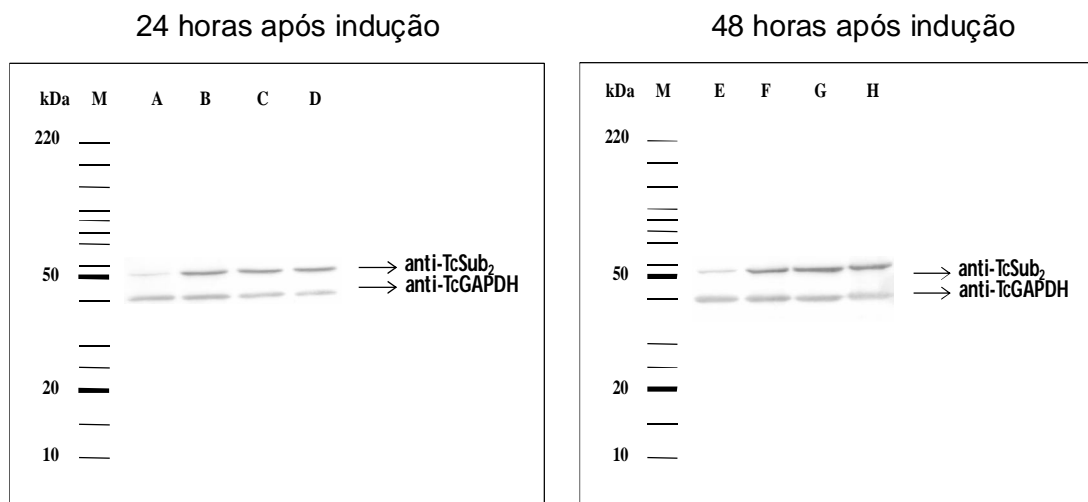
Os parasitas foram transfectados com estas construções linearizadas, selecionados com fleomicina, resistência conferida pelo vetor p2T7-177, e as populações foram avaliadas quanto à eficiência do silenciamento do gene TbSub2 após indução por tetraciclina. Inicialmente, foram feitas análises quanto a capacidade de divisão celular entre as culturas com adição de tetraciclina (indução de RNA dupla fita) e sem adição de tetraciclina (dados não mostrados). Aparentemente a indução do silenciamento de TbSub2 afetou a divisão celular. Também foi possível observar a presença de parasitas alongados após 48 horas de indução para ambos os alvos – TbSub2A e TbSub2B. No entanto, nenhuma alteração foi vista nos parasitas da cultura controle (transfectantes P2T7-177-GFP). Como o fenótipo obtido foi semelhante para os dois alvos analisados, resolvemos trabalhar apenas com a linhagem correspondente à transfecção com p2T7-177-Sub<sub>2</sub>A e este resultado está mostrado na figura 57.



**Figura 57. Curva de crescimento e morfologia de transfectantes de *T. brucei* p2T7-177-GFP e p2T7-177-TbSub2<sub>A</sub> após a indução de silenciamento do gene TbSub2 por tetraciclina. Tet -: Cultura não induzida com tetraciclina. Tet +: Cultura induzida com tetraciclina. Eixo y: Número de parasitas por mL. Eixo x. Intervalos em horas para a realização da contagem. A. Curva de crescimento de transfectantes p2T7-177-GFP tet - e tet +, com as respectivas morfologias dos parasitas após 48 horas da indução. B. Curva de crescimento de transfectantes p2T7-177-TbSub2A tet - e tet +, com as respectivas morfologias dos parasitas após 48 horas da adição de tetraciclina. As setas indicam as mudanças morfológicas observadas.**

Como pode ser observado na figura 57, para os transfectantes p2T7-177-TbSub2<sub>A</sub> (FIGURA 57 B) foi observado divisão celular normal até 24 horas após a adição de tetraciclina e somente após 48 horas ocorreu a diminuição na capacidade de divisão. Também houve alteração na morfologia com aparecimento de parasitas mais alongados na cultura. Estas alterações devem ser consequência da diminuição da expressão da proteína TbSub2, pois isto foi confirmado através de ensaios de *Western blot*, utilizando o antisoro primário específico para TbSub2. Para a normalização da quantidade de proteínas aplicadas no gel SDS-PAGE, foi utilizado o anticorpo anti-GAPDH de *T. cruzi*, mas que é específico no reconhecimento desta

proteína em *T. brucei*. Estes resultados para os transfectantes p2T7-177-GFP e p2T7-177-TbSub2A podem ser observados na figura 58.



**Figura 58. Análise de confirmação do silenciamento da proteína TbSub2 após 24 e 48 horas após indução por tetraciclina por Western blot.** Para a detecção foi utilizado antisoro primário de camundongo anti-TcSub2 em extratos de *T. brucei* de culturas induzidas e não induzidas. -  $5 \times 10^6$  células/canal em gel de poliacrilamida 13%. M: Marcador de massa molecular representado em kDa - *Benchmark* (Invitrogen). A. Cultura transfectada com p2T7-177-Sub<sub>2</sub>A induzida. B. Cultura transfectada com p2T7-177-Sub<sub>2</sub>A não induzida. C. Cultura transfectada com p2T7-177-GFP induzida. D. Cultura transfectada com p2T7-177-GFP não induzida. E. Cultura transfectada com p2T7-177-Sub<sub>2</sub>A induzida F. Cultura transfectada com p2T7-177-Sub<sub>2</sub>A não induzida. G. Cultura transfectada com p2T7-177-GFP induzida. H. Cultura transfectada com p2T7-177-GFP não induzida.

Esta diminuição na expressão da proteína TbSub2 provavelmente causou a diminuição na capacidade de divisão celular e as alterações morfológicas, indicando que este gene é essencial em *T. brucei*, corroborando com o resultado obtido com a ortóloga em *T. cruzi*.



## 5. DISCUSSÃO

A ausência de controle específico durante a transcrição em tripanossomatídeos torna os eventos pós-transcricionais importantes para a regulação da expressão gênica nestes organismos. Dentre as etapas pós-transcricionais, a exportação de mRNA do núcleo para o citoplasma ainda é carente de informações quanto ao seu mecanismo. Há poucas evidências funcionais sobre proteínas envolvidas neste evento e muitos dos dados publicados estão relacionados a estudos em organismos-modelo (KÖHLER; HURT, 2007). Levando isto em consideração, este estudo teve como objetivo inicial avaliar a conservação da via de exportação de mRNA ao longo da filogenia de eucariotos. Para tanto, optou-se por uma abordagem de genômica comparativa que abrangesse vias de exportação de diferentes RNAs, incluindo na análise sequências de proteínas de diversos eucariotos, inclusive os eucariotos basais. A escolha das proteínas a serem utilizadas como *queries* na análise comparativa foi baseada em dados na literatura que tivessem então evidências experimentais. Neste caso, focamos em estudos feitos com *S. cerevisiae*, visto que é um organismo-modelo unicelular bastante estudado quanto aos mecanismos de exportação de RNAs. O critério de validação experimental foi essencial para garantir que estaríamos trabalhando efetivamente com proteínas com função comprovada nestas vias. Com base nas proteínas selecionadas em *S. cerevisiae*, foram identificadas as proteínas ortólogas em *Homo sapiens* por ser um organismo-modelo pluricelular e possuir também evidências funcionais na literatura de proteínas ortólogas às de fungos na participação na exportação de RNAs. Também utilizamos como critério para a confirmação de ortologia em relação às proteínas de *S. cerevisiae* o banco de dados de ortólogos do Ensembl. Após a confirmação, as proteínas de humanos foram selecionadas também como *queries* para análise de comparação de proteínas em diversos eucariotos, buscando enriquecer os dados obtidos *S. cerevisiae*.

Os critérios utilizados para determinação da conservação foram exigentes quanto à similaridade e cobertura de alinhamento entre as proteínas em virtude da distância filogenética entre as sequências incluídas na análise. Esta exigência diminui o repertório de identificação mas garante a confiabilidade nos dados,

principalmente pela questão de envolver organismos basais, que divergiram há mais de 1 bilhão de anos (ROGER; HUG, 2006).

Pelas análises de conservação de proteínas foi possível perceber que algumas poucas são altamente conservadas em todas as linhagens de eucariotos, inclusive nos organismos basais. Podemos então inferir que LECA (*Last Eukaryotic Ancestor*) possuía os componentes básicos de exportação de RNAs, principalmente das vias dependentes de RanGTP. Provavelmente, a complexidade aumentou de acordo com a evolução eucariótica, com o surgimento de inovações durante a evolução, principalmente em relação à via de exportação de mRNA que é independente do gradiente de RanGTP e possui componentes específicos.

As maioria das proteínas altamente conservadas, classificadas como 1 ou 2 na análise são as que estão relacionadas com as vias de exportação de RNAs dependente de Ran-GTP, como por exemplo, as proteínas Ran, NTF2, Yrb1, Nmd3 e a exportina Crm1 (TABELA 4). Em relação à via de exportação de mRNAs, que não é dependente de gradiente de RanGTP, apesar do grande número de proteínas envolvidas em humanos e fungos, pouquíssimas são conservadas ao longo de toda a filogenia, havendo praticamente duas proteínas altamente conservadas: Sub2 e Dbp5 (TABELA 5). Os nossos dados confirmaram que o complexo SAGA apresenta-se conservado apenas em fungos, de acordo com o esperado, visto que SAGA é característico de fungos, e possui apenas algumas poucas proteínas homólogas em *H. sapiens* e *D. melanogaster* (BROWN *et al.*, 2000; CABAL *et al.*, 2006; KURSHAKOVA *et al.*, 2007; revisto por RODRÍGUEZ-NAVARRO, 2009). Por isso, acreditamos que os critérios utilizados são realmente válidos para a classificação de conservação das proteínas em outros organismos. Sendo assim, é possível sugerir que a exportação de mRNA seja uma via especializada em eucariotos superiores.

Dentre as proteínas mais conservadas está a Ran, que é importante na regulação do transporte nucleocitoplasmático de proteínas (YONEDA *et al.*, 1999; JEKELY, 2003) e de diferentes tipo de RNAs como miRNAs, tRNAs, snoRNAs, snRNAs e rRNAs (KÖHLER; HURT, 2007). Com relação a conservação em eucariotos basais, embora não haja evidências funcionais de que Ran esteja diretamente relacionada à exportação de RNAs nestes eucariotos, existem trabalhos em *T. brucei*, *Toxoplasma gondii* e no gênero *Leishmania* que verificaram que as ortólogas possuem localização nuclear, preferencialmente na periferia do núcleo, e são essenciais para a sobrevivência destes eucariotos (CASANOVA *et al.*, 2008;

FRANKEL; KNOLL, 2008; SMIRLIS *et al.*, 2009). Além disso, estes trabalhos consideram Ran como componente da exportação de proteínas e, por isso, a sua conservação pode estar relacionada a esta função. No entanto, como não podemos descartar que a exportação de RNA nos eucariotos basais possa ser uma via dependente de RanGTP, sua participação direta nesta etapa da expressão gênica ainda é especulativa.

Das proteínas relacionadas à exportação dependente de RanGTP que se apresentam conservadas em alguns eucariotos basais são Yrb1 ( RanBP1 em humanos) e NTF2 (pp15 em humanos), classificadas majoritariamente como 1 ou 2, o que indica similaridade de aminoácidos maior que 50 % e cobertura de alinhamento maior que 60 %. Esta conservação não é surpresa visto que Yrb1 é a proteína citosólica ligadora de Ran que ativa Rna1 (RanGAP em humanos), responsável pela hidrólise de RanGTP para RanGDP, sendo RanGDP importada para o núcleo através da proteína NTF2 (COUTAVAS *et al.*, 1993; BEDDOW *et al.*, 1995; RIBBECK *et al.*, 1998). Além disso, as ortólogas de Yrb1 e NTF2 em *T. brucei* foram identificadas e são essenciais para a sobrevivência celular. Neste mesmo estudo, foram identificadas que as ortólogas em *L. major* são essenciais e possuem padrão de distribuição nuclear similar à Ran, mas também sem evidências diretas de participação na exportação de RNAs (CASANOVA *et al.*, 2008). No entanto, dentro deste grupo de proteínas diretamente envolvidas no gradiente de RanGTP, a proteína Rna1 não se apresenta conservada ao longo da filogenia em nossas análises, sendo classificada como 1 ou 2 apenas em fungos e metazoários. Apesar de não esperado, este resultado pode ser real já que tampouco há evidências funcionais de ortólogos desta proteína em eucariotos basais. Uma explicação seria de que Ran possui uma atividade GTPásica intrínseca, como sugerido em trabalhos com *T. gondii* (FRANKEL; KNOLL, 2008), onde não foi identificado um homólogo de Rna1 e por isso, os autores propõem que Ran possivelmente possa suprir a necessidade de Rna1 neste eucarioto. Outra proteína que não está altamente conservada é Srm1 (RCC1 em humanos), uma proteína nuclear cuja função é realizar a troca de GDP por GTP na proteína Ran, mantendo a concentração elevada de RanGTP no núcleo em fungos e metazoários (BISCHOFF; PONSTINGL, 1991; NAKIELNY; DREYFUSS, 1999). Tanto a proteína de humanos RCC1 quanto a de fungos Srm1 foram classificadas como 3 ou 4 ao longo da filogenia indicando uma similaridade menor que 50% entre os aminoácidos e cobertura de alinhamento

menor que 60 % entre as sequências comparadas, o que indica provavelmente um alinhamento entre os domínios das proteínas. Existem evidências de ortologia em eucariotos basais devido à presença de uma proteína que possui alguns motivos funcionais conservados, mas aparentemente nenhum protozoário codifica para uma proteína RCC1 típica de eucariotos superiores, ou seja, que possua todos os motivos funcionais encontrados em Srm1/RCC1. Em *T. gondii* e *P. falciparum* as ortólogas identificadas são nucleares de função similar à RCC1. Embora possuam apenas alguns domínios similares à RCC1, são capazes de complementar a função em mamíferos mantendo o gradiente de Ran nas células (DAR-DER *et al.*, 1998; FRANKELL; KNOLL, 2008). Com isso a baixa similaridade encontrada não descarta a possibilidade de haver homólogas em eucariotos basais.

Ainda dentro do grupo de proteínas que participam de vias dependentes de RanGTP, podemos citar as exportinas. Entre as analisadas neste trabalho, Msn5 (XPO5 em humanos) e Los1 (XPOt em humanos), estão relacionadas majoritariamente à exportação de miRNAs e tRNAs em eucariotos superiores, respectivamente (SARKAR; HOPPER, 1998; SHIBATA *et al.*, 2006). Na análise de conservação de Msn5/XPO5, a maioria dos resultados encontrados foram descartados por apresentarem *e-value* maior que o valor de corte determinado nos nossos critérios e portanto foram classificados como “NH”, o que indica a ausência de proteínas similares ao longo da filogenia. Em relação à análise de Los1/XPOt os resultados foram classificados entre 3 e 5, indicando baixa similaridade entre as sequências comparadas, principalmente em eucariotos basais. Isto pode ser explicado pelo fato de não serem fatores essenciais na exportação dos respectivos RNAs. Por exemplo, a deleção de Los1 não é suficiente para bloquear a exportação de tRNAs em *S. cerevisiae*, *S. pombe* e *A. thaliana* (HURT *et al.*, 1987; LI; CHEN, 2003; STEINER-MONSONY; MANGROO, 2004). Existe um trabalho que buscou construir a árvore filogenética apenas de exportinas em eucariotos, incluindo também as linhagens basais. Contudo, o critério utilizado pelo grupo foi apenas o *e-value* e neste caso, os resultados indicaram a presença de ortólogas de Los1/XPOt em algumas espécies pertencentes aos supergrupos Chromalveolates e Excavates, como *P. falciparum*, *T. brucei* e *T. cruzi* (MURPHY; DANCIS; BROWN, 2008). Se tivéssemos usados como critério apenas o valor de *e-value* nós teríamos encontrado ortólogos de Los1 em eucariotos basais. Mas optamos por adicionar outros critérios, como similaridade e cobertura de alinhamento entre as proteínas, tornando a nossa

linha de corte mais exigente se comparada a estabelecida no trabalho de Murphy e colaboradores. Além disso, ainda não há evidências funcionais relacionadas à exportação de tRNAs em eucariotos basais e não podemos afirmar que os ortólogos de Los1/XPOt sejam os responsáveis pela exportação de tRNA nestes organismos. Com relação a Msn5/XPO5, um ponto interessante é que a ausência de XPO5 não deve refletir a ausência de miRNAs, pois algumas espécies cuja proteína não está conservada, como *T. brucei* e *T. vaginalis*, possuem miRNAs (DIKENG *et al.*, 2001; LIN *et al.*, 2009). A exportina XPO5 também é considerada um receptor auxiliar na exportação de tRNAs em alguns organismos através da interação com eEF1A, um fator de alongação (BOHNSACK *et al.*, 2002; TAKANO; ENDO; YOSHIHISA, 2005; MCGUIRE; MANGROO, 2007), que inclusive participa, em alguns casos, da exportação de tRNAs através da interação direta com tRNAs aminoacetilados sem a necessidade de exportinas (SARKAR; HOPPER, 1998; GROSSHANS; HURT; SIMOS, 2000). Embora eFIA seja uma proteína altamente conservada sendo classificada majoritariamente como 1 ao longo da filogenia e possua certa independência funcional na exportação de alguns tRNAs, também não há evidências funcionais relacionadas à exportação em eucariotos basais. Enfim, como não existem evidências que estabeleçam que ortólogos de Msn5/XPO5 e Los1/XPOt exportam tRNA e miRNA em eucariotos basais, acreditamos que ortólogos de outras exportinas ou exportinas diferentes sejam as responsáveis pela exportação destes tipos de RNAs.

A exportina que está mais conservada na filogenia de eucariotos é a Crm1 (XPO1 em humanos) que é considerada em eucariotos superiores o receptor principal de exportação nuclear dependente de RanGTP. Crm1/XPO1 interage com proteínas que possuam o sinal de exportação (NES), rico em leucina, e viabiliza a exportação tanto destas proteínas quanto de snRNAs, rRNAs e alguns mRNAs associados a elas (GALLOUZI *et al.*, 2000; CULLEN, 2003; HUTTEN; KEHLENBACH, 2007).

Para exportação de snRNAs e snoRNAs em metazoários, foi demonstrado que XPO1 interage com as proteínas PHAX, RanGTP e o complexo de ligação ao cap (CBC) para a exportação eficiente destes pequenos RNAs (OHNO *et al.*, 2000; WATKINS; LEMM; LÜHRMANN *et al.*, 2007). A proteína PHAX é uma proteína típica de humanos, aparentemente não há homologas em fungos que permitam a associação entre XPO1 a CBC para a exportação desses RNAs (OHNO *et al.*, 2000;

MATERA; TERNES; TERNES, 2007). Nossos dados também mostraram que apesar da conservação de Crm1/XPO1 em eucariotos basais, PHAX está conservada apenas em algumas espécies do grupo de metazoários e até o momento não existem proteínas em eucariotos basais com a mesma função de PHAX. Com isso, podemos propor que a proteína PHAX seja um caso de aquisição tardia ao longo da evolução. No entanto, um padrão diferente foi observado para CBC que é formado por duas subunidades denominadas de proteínas ligadoras de cap (CBP): CBP20, que interage diretamente com o cap, e CBP80, que aumenta a afinidade de ligação de CBC (CALERO *et al.*, 2002; CHENG *et al.*, 2006). Apesar de CBC interagir com XPO1, na nossa análise, apenas a subunidade CBP20 apresenta-se conservada em eucariotos basais, sendo classificada como 1 ou 2. Isto pode ser explicado pelo fato de que existam diferenças na estrutura do CAP nestes organismos em comparação ao CAP de metazoários, o que poderia modificar os fatores pertencentes ao complexo de reconhecimento desta estrutura. Pela literatura, esta é uma possibilidade viável no caso de tripanossomatídeos, pois eles possuem alterações no cap devido à adição de 4 nucleotídeos modificados ao m<sup>7</sup>G cap. Em *T. brucei*, o complexo CBC existe mas, diferentemente do encontrado em outros eucariotos, possui cinco subunidades, sendo que nenhuma é similar a CBP80 mesmo que tenha sido demonstrado que a ortóloga de CBP20 interage diretamente com o cap (LI; TSCHUDI, 2005).

Crm1/XPO1 que é altamente conservada pelos nossos dados, sendo classificada como 1 ou 2 ao longo da filogenia, também é fator majoritário tanto na exportação de proteínas e de rRNAs (MOY; SILVER, 1999, GLEIZES *et al.*, 2001; HUTTEN; KEHLENBACH, 2007). Pode ser que a conservação seja devido a sua participação no transporte de proteínas, mas não podemos descartar a importância na exportação de rRNAs. Neste caso, esta exportina é recrutada por Nmd3, um fator pré-ribossomal que contém o sinal de exportação rico em leucina (NES) e se associa com a partícula pré-60S (HO; KALLSTROM; JOHNSON, 2000; GADAL *et al.*, 2001). Nossos resultados mostraram que da mesma forma que XPO1, Nmd3 também se apresenta altamente conservada ao longo da filogenia de eucariotos e sua interação com XPO1 e algumas proteínas do complexo da subunidade ribossomal 60S, já foi comprovada por ensaios biológicos em *T. brucei*. Estes fatos confirmam que nossos dados podem inferir a existência de ortólogos funcionais de Crm1/XPO1 e Nmd3 na exportação de rRNAs em eucariotos basais (PROHASKA; WILLIAMS, 2009). Além

disso, podemos sugerir que a via de exportação de rRNA é uma das vias de exportação de RNAs mais conservada ao longo da filogenia.

Devemos chamar a atenção também para dados em *T. cruzi*, onde o bloqueio da função de TcCRM1 por leptomicina B (LMB) causa o acúmulo nuclear de mRNAs que codificam, por exemplo, para TcUBP1/2 e PABP. Isto sugere então o envolvimento desta exportina com a exportação de mRNAs neste tripanossomatídeo (CUEVAS; FRASCH; D'ORSO, 2005). Contudo ainda não foram realizados estudos abrangentes que buscassem uma descrição mais detalhada dos componentes envolvidos nesta via em *T. cruzi*. E também ainda não é possível afirmar que existe outra via que possa exportar mRNAs nestes organismos. De qualquer forma, já foi mostrado que CRM1 é um fator de exportação de apenas alguns mRNAs e que existe outra via com papel majoritário em eucariotos. As primeiras evidências da existência de outra via não dependente de CRM1 para a exportação da maioria dos mRNAs surgiram em estudos com *S. cerevisiae* (NEVILLE; ROSBASH, 1999). Os autores mostraram que a inativação de CRM1 por LMB resulta no acúmulo de mRNA no núcleo. No entanto, não houve diferença na taxa de tradução após o tratamento, sugerindo que o acúmulo observado não seria suficiente para afetar a tradução da maioria dos mRNAs. Este trabalho propôs pela primeira vez, a existência de uma via diferente da dependente de CRM1/XPO1 que seria então responsável pela exportação da maioria dos mRNAs. Trabalhos posteriores confirmaram que a via principal de exportação de mRNA em eucariotos superiores contém componentes diferentes, como o complexo TREX e/ou TREX-2, sendo o dímero Mex67-Mtr2 (TAP-p15, em humanos) o receptor que tem papel central na exportação pelo NPC e liberação do transcrito no citoplasma (SANTOS-ROSA *et al.*, 1998; GRÜTER *et al.*, 1998). Por fim, análises do transcriptoma de *D. melanogaster* demonstraram que o silenciamento de XPO1 (CRM1) não afetou a exportação da grande maioria de mRNAs, enquanto o silenciamento de TAP e p15 resultou em acúmulo nuclear da maior parte dos mRNAs (HEROLD; TEIXEIRA; IZAURRALDE, 2003).

Nossos dados mostram que a maioria das proteínas especificamente presentes na via de exportação de mRNAs em eucariotos superiores não estão conservadas em eucariotos basais, inclusive quando se trata do receptor principal, TAP-p15 (Mex67-Mtr2). Através da análise comparativa, foi observado que a conservação deste dímero está restrita a fungos e metazoários, sendo os resultados

para Mex67/TAP majoritariamente classificados como 4 ou 5, enquanto Mtr2/p15 classificados como NH ao longo da filogenia. Foi publicado um trabalho sobre uma "Mex67-like" em *T. brucei* cujo silenciamento resulta em acúmulo de mRNA poliadenilados no núcleo (SCHWEDE *et al.*, 2009), e pode ser que a sequência identificada, mesmo que com baixa similaridade com a Mex67, possa ser o receptor da exportação de mRNAs neste organismo. Ainda assim, vale ressaltar que existe a necessidade de ensaios funcionais mais elaborados para elucidar se o fenótipo observado resultou na ausência de exportação ou se foi devido à função em outra etapa do metabolismo nuclear de RNA.

Dentre as proteínas relacionadas à exportação de mRNAs em eucariotos superiores que estão bem conservadas ao longo da filogenia podemos citar: as helicases Sub2 e Dbp5, ortólogas de UAP56 e DDX19 de humanos respectivamente. Estas helicases pertencem à família DEAD-box por possuírem 9 motivos conservados ao longo da estrutura primária e cujo nome deve-se ao motivo II (DEAD) encontrado na maioria das proteínas. Estes motivos apresentam-se distribuídos em dois domínios globulares relacionados à atividade ATPase, afinidade de ligação à RNA e promoção de mudanças conformacionais nas interações entre duplex DNA-RNA ou entre RNAs e proteínas (CORDIN *et al.*, 2006).

Em eucariotos superiores Sub2/UAP56 se associa cotranscricionalmente com pré-mRNAs através da interação com THO, Tex e Yra1 originando o complexo TREX (REED; CHENG, 2005). Também existem evidências de que além da exportação, esta proteína também estaria relacionada às etapas iniciais da montagem do "spliceossomo" (FLECKNER *et al.*, 1997; LIBRI *et al.*, 2001; WAHL; WILL; LÜHRMANN, 2009). Após o processamento do pré-mRNA, Sub2/UAP56 promove a liberação deste para o receptor de exportação Mex67-Mtr2 (TAP-p15) e se desliga do mRNP permanecendo no núcleo (STRÄSSER; HURT, 2001). O transcrito é então levado pelo dímero até o poro nuclear onde há a interação com a helicase Dbp5/DDX19, localizada na face citoplasmática do NPC, que promove a liberação deste no citoplasma para o complexo de tradução (SCHMITT *et al.*, 1999; ZHAO *et al.*, 2002). Apesar da alta conservação de Sub2/UAP56, apenas um estudo foi feito em eucariotos basais, no qual se observou que a ortóloga de *P. falciparum* trata-se de uma proteína nuclear que possui afinidade ao RNA e atividade ATPase (SHANKAR; PRADHAN; TUTEJA, 2008). Já para Dbp5/DDX19, nenhum trabalho que demonstrasse a sua função em eucariotos basais foi publicado até o momento.



Em virtude da alta conservação de Sub2/UAP56 atrelada à ausência de caracterização dos mecanismos da via de exportação de mRNA em tripanossomatídeos, optamos por focar as análises funcionais na ortóloga de *T. cruzi*, denominada então de TcSub2. Ela está anotada como uma RNA helicase hipotética em *T. cruzi* e as análises de sequência e predição estrutural mostraram que, assim como a de levedura, é uma proteína que pertence a família DEAD-box. Foi possível notar mudanças de aminoácidos nos motivos conservados, por exemplo, em *T. cruzi* existe uma fenilalanina no lugar da cisteína do motivo II (DECD) típico de Sub2 e UAP56. Contudo, apesar da fenilalanina (F198) de TcSub2 ter caráter apolar e possuir cadeia lateral maior que a cisteína (C198) de UAP56, a presença de uma cisteína espacialmente próxima à fenilalanina (C201) em TcSub2 compensa espacialmente este aminoácido e mantém a estrutura típica do domínio DECD. Desta forma, a predição estrutural além de mostrar altas semelhanças com a UAP56 de humanos, identificou que as diferenças na composição de aminoácidos não interferem com a estrutura tridimensional, mostrando que existe uma conservação dos motivos funcionais desta helicase.

Com estes dados em mãos, partimos para uma avaliação da homologia através de ensaios funcionais. Os dados de expressão indicaram que esta proteína é constitutiva, pois não observamos alteração na sua síntese ao longo do ciclo de vida. Além disso, pudemos verificar que, da mesma forma que em outros eucariotos, trata-se de uma proteína exclusivamente nuclear. Também notamos que a sua distribuição não é homogênea, pois foi possível notar através das análises de microscopia de fluorescência, regiões com maior concentração da proteína, visualmente semelhante a pontos ao redor do núcleo. Esta distribuição é semelhante ao observado para as proteínas homólogas em eucariotos superiores como *S. cerevisiae* (Sub<sub>2</sub>), *H. sapiens* (UAP56), *Chiromonus tentans* (*C. tentans*) (HEL), *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*) (HEL) e *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) (HEL). Nesses organismos foi verificado que existem regiões do núcleo onde essas proteínas apresentam-se mais concentradas. Estes agregados são conhecidos como "speckles" e são típicos de proteínas relacionadas ao processamento como Srm160 e SC-35, que foram inclusive utilizadas como marcadores para verificar a associação de UAP56 e HEL ao processamento de mRNA em humanos e *D. melanogaster* respectivamente (EBERL *et al.*, 1997; GATFIELD *et al.*, 2001; STRÄSSER; HURT, 2001; KIESLER; MIRALLES; VISA,

2002; MACMORRIS; BROCKER; BLUMENTHAL, 2003; CUSTÓDIO *et al.*, 2004). Foi observado que UAP56 e HEL colocalizam com estes “speckles”, bem como se encontram ao redor deles. Estudos de posicionamento de genes ativos mostraram que estas regiões próximas de sítios de processamento estão relacionadas à transcrição ativa de mRNAs (NIELSEN; HUDSON; ARMSTRONG, 2002; SHOPLAND *et al.*, 2003; BROWN *et al.*, 2008).

Partindo de evidências das proteínas ortólogas de TcSub2 que estão relacionadas com a transcrição, foram realizadas análises de imunocitoquímica ultraestrutural para observar a relação de TcSub2 com a cromatina. Foi observada então uma distribuição não homogênea, que representa agrupamentos em regiões de cromatina mais frouxa com tendência de associação na periferia da cromatina mais densa. Em humanos e *C. tentans*, HsaUAP56 e HEL também estão distribuídas na periferia dos domínios de cromatina mais densa denominados de agrupamentos de grânulos de cromatina, IGCs (KIESLER; MIRALES; VISA, 2002; KOTA *et al.*, 2008). Estes IGCs, visíveis na microscopia de transmissão, correspondem aos “speckles”, visíveis em microscopia de fluorescência, e são formados pelo aglomerado de proteínas de processamento, principalmente SC-35, além de estarem intimamente associados às fibrilas pericromatínicas (PFs) onde ocorre a transcrição de mRNAs (revisto por SPECTOR, 2003 e ZHAO; BODNAR; SPECTOR, 2009). Outras evidências mostram que mRNAs nascentes estão presentes principalmente na periferia de domínios de cromatina mais compacta, ou seja, há a deposição dos transcritos recém-sintetizados nos espaços intercromatínicos (IBORRA *et al.*, 1996; CMARKO *et al.*, 1999; VERSCHURE *et al.*, 1999; CREMER; CREMER, 2001). Um trabalho recente em *T. cruzi* mostrou que histonas H4 acetiladas possuem o perfil de distribuição nuclear nos espaços entre cromatina densa e frouxa (espaços intercromatínicos) que poderiam realmente ser regiões de transcrição de mRNAs neste parasita (NARDELLI *et al.*, 2009). Sendo assim, a associação de TcSub2 com regiões do núcleo de *T. cruzi* semelhantes às fibrilas pericromatínicas ou intercromatínicas indicam que TcSub2 estaria associada à transcrição de mRNA. Além disso, nenhuma marcação foi observada no nucléolo, corroborando esta hipótese.

Levando em consideração o perfil de distribuição nuclear de TcSub2 e as evidências de associação a sítios ativos de transcrição observadas nas homólogas de eucariotos superiores, foram então realizados ensaios de colocalização com

marcação de RNAs nascentes (incorporação de BrUTP) em *T. cruzi*. O protocolo utilizado neste trabalho foi otimizado para transcrição de RNA Polimerase II, para que pudéssemos verificar se esta associação também ocorreria neste parasita. Os resultados de colocalização indicam que TcSub2 está associada a sítios ativos de transcrição de mRNA e foram confirmados após a inativação da RNA Polimerase II (RNA pol. II) por  $\alpha$ -amanitina. Após este tratamento, a marcação para RNA nascentes caiu drasticamente e apenas um sinal mais forte ocorreu próximo ao nucléolo, indicativo de transcrição dirigida por RNA pol. I, pois na concentração utilizada a inibição ocorria apenas para RNA pol. II e pol. III. Apesar de inativada a transcrição de RNA Pol II, o sinal referente a TcSub2 não diminuiu, havendo apenas uma diminuição leve no padrão de agregados, mas nada muito consistente. No entanto, foi clara a ausência de sobreposição de sinais entre as marcações por microscopia confocal. Foi também utilizada uma concentração da droga para inibição apenas de RNA pol. II, não havendo inativação das RNA pol. I e III, e o sinal foi semelhante ao observado quando havia apenas transcrição de RNA pol. I, provavelmente pelo fato do protocolo ser otimizado para a transcrição por RNA Pol. II. Da mesma forma, apenas um sítio localizado no nucléolo foi detectado e tampouco foi observada a colocalização deste sítio com TcSub2. Foi verificado portanto que há uma especificidade de associação de TcSub2 a sítios de transcrição de mRNAs no núcleo de *T. cruzi*.

Os dados gerados até o momento levam para um caminho de que TcSub2 realmente possui características semelhantes às proteínas homólogas de outros eucariotos, ou seja, associação específica a sítios de transcrição de RNA pol. II e consequentemente de RNA mensageiro. A associação parcial observada neste trabalho, pode ser explicada pela dinâmica de interação entre os diferentes eventos dentro da célula, onde regiões do DNA estariam em estados diferentes de transcrição. A outra possibilidade seria de que TcSub2 estaria relacionada à transcrição de determinados mRNAs, consequência talvez de um possível papel regulatório na expressão gênica. Enfim, a sua associação a sítios de transcrição de mRNA não é suficiente para determinar que TcSub2 está realmente atuando na exportação, por isso, análises genéticas necessitam ser concluídas para verificar em que etapa do metabolismo nuclear de mRNA ela teria o papel principal. Para tanto, o próximo passo foi obter linhagens nocaute de *T. cruzi* para avaliar o fenótipo gerado após a ausência da proteína. Neste caso, a ideia seria avaliar se isto poderia causar

o acúmulo de mRNA no núcleo. Embora o nocaute de um alelo não foi suficiente para gerar diferenças na morfologia das células bem como na taxa de divisão celular, a obtenção do nocaute duplo parece ser inviável e assim podemos concluir que a proteína, como nos outros eucariotos, é essencial para a sobrevivência da célula.

A alternativa encontrada foi avaliar a similaridade entre TcSub2 e a proteína ortóloga em *T. brucei* para que pudéssemos utilizar o método de RNA interferência para o silenciamento induzível da expressão do gene TbSub2 e assim inferir o papel da respectiva proteína em *T. cruzi*. Como as proteínas TcSub2 e TbSub2 são altamente similares, acreditamos que a função desta proteína em *T. brucei* seja semelhante a de *T. cruzi*. Os primeiros dados fenotípicos obtidos após o silenciamento da expressão do gene de TbSub2 corroboram com os de *T. cruzi*: de que a proteína é essencial, pois a diminuição desta proteína afeta o crescimento após 24 horas de indução por tetraciclina seguido de mudanças na morfologia, resultando em parasitas mais alongados. No entanto, precisamos investigar se essa morfologia alongada possa ser um reflexo da participação da proteína TcSub2 na exportação de mRNAs.

As homólogas de eucariotos superiores estão relacionadas a sítios ativos de transcrição de mRNAs e são responsáveis pela associação com a exportação destes transcritos (REED; CHENG, 2005; AGUILERA, 2005; KÖHLER; HURT, 2007). Em *C. tentans* por exemplo, foi observado que a proteína HEL se associa a *loci* transcritionalmente ativos de cromossomos politênicos das glândulas salivares e participa no transporte de mRNA até o poro nuclear, sendo liberada antes mesmo do complexo mRNA alcançar o citoplasma, permanecendo no núcleo (KIESLER; MIRALLES; VISA, 2002).

Já o papel de UAP56 na exportação foi comprovado através de acúmulo de mRNAs poliadenilados no núcleo após 24 horas de silenciamento do gene UAP56 por siRNA (KAPADIA *et al.*, 2006). Mutações em UAP56 também foram responsáveis pela diminuição significativa da exportação de mRNAs de  $\beta$ -globina que se acumularam no núcleo das células (KOTA *et al.*, 2008). Isto foi corroborado por um trabalho mais recente em células HeLa que também observou a relação de UAP56 com a exportação de mRNAs. Foi verificado que a expressão de UAP56 mutada resultou em diminuição significativa na síntese protéica devido à ausência da maioria dos mRNAs disponíveis para a tradução no citoplasma. Neste mesmo

trabalho também foi obtido um resultado complementar em cardiomiócitos de ratos através de silenciamento de UAP56, resultando no mesmo fenótipo de diminuição significativa de síntese protéica e inibição do crescimento celular (SAHNI; WANG; ALEXIS, 2010).

Esta relação entre diminuição de proteína e acúmulo de mRNAs poliadenilados no núcleo também foram relatadas em proteínas homólogas de *S. cerevisiae*, *C. elegans* e *D. melanogaster* (GATFIELD *et al.*, 2001; STRÄSSER; HURT, 2001; MACMORRIS; BLOCKER BLUMENTHAL, 2003). Em *D. melanogaster* também foi comprovada a diminuição de síntese protéica devido ao acúmulo nuclear de mRNAs pelo silenciamento de HEL na célula (GATFIELD *et al.*, 2001). Um estudo posterior de transcriptoma do grupo da Elisa Izaurralde (2003) verificou que após o silenciamento de HEL a maioria dos mRNAs permanecem no núcleo, confirmando a relação desta proteína à exportação de mRNA neste eucarioto (HEROLD; TEIXEIRA; IZAURRALDE 2003).

Enfim, a obtenção de linhagens de *T. brucei* que permitiram o silenciamento da expressão de TbSub2 foi crucial para que possamos dar início aos estudos voltados para a verificação da associação desta proteína com a exportação de mRNAs. Neste caso, pretendemos analisar o acúmulo de mRNAs no núcleo após o silenciamento do gene, seguido de marcação metabólica de proteínas sintetizadas durante este período para verificarmos alterações na taxa de tradução. Adicionalmente, poderemos enriquecer os dados de função de TcSub2 através da análise de proteínas que interagem com ela em tripanossomatídeos. A identificação será possível através de ensaios de proteômica tanto em *T. cruzi* como em *T. brucei*. Todas as evidências a serem geradas responderão em que contexto do metabolismo nuclear de RNA TcSub2 está inserida.

## 6. CONCLUSÕES

- Análises de genômica comparativa permitiram identificar quais proteínas, componentes da exportação núcleo-citoplasma de diferentes tipos de RNAs, são conservadas ao longo da filogenia de eucariotos, inclusive em linhagens basais. Além disso, foi possível ver que entre as vias de exportação de RNA, a via de mRNA é menos conservada de todas.
- Uma proteína de *T. cruzi* anotada como RNA helicase hipotética, denominada neste trabalho de TcSub2, foi a mais conservada entre os componentes da via de exportação de mRNA.
- A predição da estrutura tridimensional de TcSub2 mostrou que os domínios funcionais da proteína são muito conservados quanto comparada com a ortóloga em humanos, UAP56.
- A proteína TcSub2 é exclusivamente nuclear, não regulada em nível de expressão proteica e está relacionada com sítios de transcrição pela RNA Polimerase II.
- A proteína ortóloga de Sub<sub>2</sub> é essencial para a sobrevivência de *T. cruzi* e *T. brucei*, visto que o nocaute duplo em *T. cruzi* não é viável e o silenciamento deste gene por RNAi em *T. brucei* leva a alterações morfológicas e afeta a divisão celular dos parasitas.

## 7. PERSPECTIVAS

- Confirmar se a obtenção do nocaute duplo do gene TcSub2 é realmente inviável. Caso não seja viável esta estratégia, testaremos uma abordagem de nocaute induzível através da fusão de domínio de desestabilização de proteínas (DD) com TcSub2 nos parasitas que já possuem um alelo deste gene nocauteado.
- Analisar o acúmulo nuclear de mRNAs por FISH de RNA poli-A. em *T. cruzi* e *T. brucei* após silenciamento dos genes TcSub2 e TbSub2.
- Verificar se o acúmulo de mRNA acarretaria na diminuição da síntese protéica por ensaios de marcação metabólica com metionina.
- Analisar as proteínas associadas a TcSub2 e TbSub2 por análises de proteômica para auxiliar na compreensão do contexto do metabolismo nuclear de mRNA no qual a proteína está inserida.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMOFF, M.D.; MAGELHAES, P.J.; RAM, S.J. Image Processing with ImageJ. **Biophotonics International**. v. 11, p. 36-42. 2004.

ABRUZZI K.C.; LACADIE, S.; ROSBASH, M. Biochemical analysis of TREX complex recruitment to intronless and intron-containing yeast genes. **EMBO J.** v. 23, p. 2620-2631. 2004.

AGUILERA, A. Cotranscriptional mRNP assembly: from the DNA to the nuclear pore. **Current Opinion in Cell Biology**. v. 17, n. 3, p. 242–250. 2005.

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.** v. 25, p. 3389-3402. 1997.

ANDRADE, Z. A. Immunopathology of Chagas Disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v. 94, p. 71-80. 1999.

ANDREWS, N.W. Living dangerously: how *Trypanosoma cruzi* uses lysosomes to get inside host cells, and then escapes into the cytoplasm. **Biol. Res.** v. 26, n. 1-2, p. 65-7. 1993.

ANSELM, A.; PÍFANO, F.; SUAREZ, J.A.; GURDIEL, O. Myocardiopathy in Chagas disease. I Comparative study of pathologic findings in chronic human and experimental Chagas myocarditis. **Am Heart J.** v. 72, p. 469-481. 1966.

AURRECOECHEA, C.; HEIGES, M.; WANG, H.; WANG, Z.; FISCHER, S.; RHODES, P.; MILLER, J.; KRAEMER, E.; STOECKERT, C.J.J.; ROOS, D.S.; KISSINGER, J.C. ApiDB: integrated resources for the apicomplexan bioinformatics resource center. **Nucleic Acids Research**. v. 35, p. 427-30. 2007.

AUSUBEL, F.M.; BRENT, T.R.; KINGSTON, R.E. Current Protocols in Molecular Biology. **New York, Green Publishing Associates and Wiley & Sons**. 1987.

ÁVILA, A.R.; YAMADA-OGATTA, S.F.; DA SILVA MONTEIRO, V.; KRIEGER, M.A. NAKAMURA, C.V.; DE SOUZA, W.; GOLDENBERG, S. Cloning and characterization of the metacyclogenin gene, which is specifically, expressed during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 117, n. 2, p. 169-170. 2001.



BALANÑA-FOUCE, R.; REGUERA, R.M. RNA interference in *Trypanosoma brucei*: a high-throughput engine for functional genomics in trypanosomatids? **Trends Parasitol.** v. 23, n. 8, p. 348-51. 2007.

BATISTA M. Construção de vetores para caracterização de genes de *Trypanosoma cruzi* em um sistema para clonagem em alta demanda. 123 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

BELTRÃO H.B. M., CERRONI M.P., FREITAS D.R.C., PINTO A.Y.N., VALENTE S.A., COSTA S.A., SOBEL J. Investigation of two outbreaks of suspected oral transmission of acute Chagas disease in the Amazon region, Pará State, Brazil, in 2007. **Trop. Doct.** V. 39, n. 4, p. 231-232.

BEDDOW A. L., RICHARDS S. A., OREM N. R., MACARA I. G. The Ran/TC4 GTPase-binding domain: identification by expression cloning and characterization of a conserved sequence motif. **PNAS.** v. 92, n. 8, p. 3328-3332. 1995.

BIRNBOIM H. C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Res.** v. 7, p. 1513-1523. 1979.

BISCHOFF, F.R.; PONSTINGL, H. Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by the mitotic regulator RCC1. **Nature**, v. 354, p. 80–82. 1991.

BLOBEL, G. 1985. Gene gating: a hypothesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v. 82, p. 8527–8529.

BOGERD, H.P.; FRIDELL, R.A.; BENSON, R.E.; HUA, J.; CULLEN, B.R. Protein sequence requirements for function of the human T-cell leukemia virus type 1 Rex nuclear export signal delineated by a novel in vivo randomization-selection assay. **Moll. Cell. Biol.** v. 16, p. 4207-4214. 1996.

BOHNSACK, M.T.; REGENER, K.; SCHWAPPACH, B.; SAFFRICH, R.; PARASKEVA, E.; HARTMANN, E.; GÖRLICH, D. Exp5 exports eEF1A via tRNA from nuclei and synergizes with other transport pathways to confine translation to the cytoplasm. **EMBO J.** v. 21, n. 22, p. 6205-6215. 2002.

BONALDO, M.C.; SOUTO-PADRON, T.; DE SOUZA, W.; GOLDENBERG, S. Cell-substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. **J. Cell. Biol.** v. 106, p. 1349-1358. 1988.

BOOTHROYD, J.C.; GROSS, G.A. Transcripts coding variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei* have a short, identical exon at their 5' end. **Gene**. v. 20, p. 281-289. 1982.

BROWN, C.E.; LECHNER, T.; HOWE, L.; WORKMAN, J.L. The many HATs of transcription coactivators. **Trends Biochem. Sci.** v. 25, n. 1, p. 15-9. 2000.

BROWN, J.M.; GREEN, J.; NEVES, R.P.; WALLACE, H.A.; SMITH, A.J.; HUGHES, J.; GRAY, N.; TAYLOR, S.; WOOD, W.G.; HIGGS, D.R.; IBORRA, F.J.; BUCKLE, V.J. Association between active genes occurs at nuclear speckles and is modulated by chromatin environment. **J. Cell. Biol.** v. 182, p. 1083-1097. 2008.

BRUN, R.; SCHONONBERGER, M. Cultivation and in vitro cloning of procyclic culture forms of *Trypanosoma brucei* in a semi-defined medium. **Short communication - Acta Trop.** v. 36, p. 289-292. 1979.

CABAL, G.G.; GENOVESIO, A.; RODRIGUEZ-NAVARRO, S.; ZIMMER, C.; GADAL, O.; LESNE, A.; BUC, H.; FEUERBACH-FOURNIER, F.; OLIVO-MARIN, J.; HURT, E.C.; NEHRBASS, U. SAGA interacting factors confine sub-diffusion of transcribed genes to the nuclear envelope. **Nature**. v. 441, p. 770-773. 2006.

CÁCERES, J.F.; SCREATON, G.R.; KRAINER, A.R. A specific subset of SR proteins shuttles continuously between the nucleus and the cytoplasm. **Genes Dev.** v. 12, p. 55-66. 1998.

CALERO, G.; WILSON, K.F.; LY, T.; RIOS-STEINER J.L.; CLARDY, J.C.; CERIONE, R.A. Structural basis of m7GpppG binding to the nuclear cap binding protein complex. **Nat. Struct. Biol.** v. 9, p. 912-917. 2002.

CAMARGO, E.P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**. v. 6, p. 93-100. 1964.

CAMPBELL, D.A.; THOMAS, S.; STURM, N.R. Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal? **Microbes and Infection**. v. 5, p. 1231-1240. 2003.

CARO, F.; BERCOVICH, N.; ATORRASAGASTI, C.; LEVIN, M.J.; VÁZQUEZ, M.P. *Trypanosoma cruzi*: analysis of the complete PUF RNA-binding protein family. **Exp Parasitol.** v. 113, p. 112-124. 2006.

CASANOVA, M.; PORTALÈS, P.; BLAINEAU, C.; CROBU, L.; BASTIEN, P.; PAGÈS, M. Inhibition of active nuclear transport is an intrinsic trigger of programmed

cell death in trypanosomatids. **Cell death and differentiation**. v.15, n. 12, p. 1910-20. 2008.

CASSOLA, A.; FRASCH, A.C. An RNA recognition motif mediates the nucleocytoplasmic transport of a trypanosome RNA-binding protein. **J. Biol. Chem.** v. 284, p. 35015–35028. 2009.

CASTELLANI, O.; RIBEIRO, L.V.; FERNANDES, J.F. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* in culture. **J. Protozool.** v. 14, n.3, p. 447-451. 1967.

CHAGAS, C. New human trypanosomiasis. Morphology and life cycle of *Schyzotrypanum cruzi*, the cause of a new human disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v. 1, p. 159-218. 1909.

CHAVEZ, S.; BEILHARZ, T.; RONDON, A.G.; ERDJUMENT-BROMAGE H.; TEMPST, P.; SVEJSTRUP, J.Q.; LITHGOW, T.; AGUILERA, A. A protein complex containing Tho2, Hpr1, Mft1 and a novel protein Thp2, connects transcription elongation with mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. **EMBO J.** v. 19, p. 5824-5834. 2000.

CHEN, C.Y.; SHYU, A.B. AU-rich elements: Characterization and importance in mRNA degradation. **Trends Biochem. Sci.** v. 20, p. 465–470. 1995.

CHENG, H.; DUFU, K.; LEE, C.S.; HSU, J.L.; DIAS, A.; REED, R. Human mRNA Export Machinery Recruited to the 5' End of mRNA. **Cell**. v.127, n. 12, p. 1910-20. 2006.

CLAYTON, C.E. Life without transcriptional control? From fly to human and back again. **EMBO J.** v. 21, p. 1881-1888. 2002.

CLAYTON, C.; SHAPIRA, M. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 156, p. 93-101. 2007.

CMARKO, D.; VERSCHURE, P.; MARTIN, T.E.; DAHMUS, M.E.; KRAUSE, S.; FU, X.; VAN DRIEL, R.; FAKAN, S. Ultrastructural Analysis of Transcription and *Splicing* in the Cell Nucleus after Bromo-UTP Microinjection. **Molecular Biology of the Cell**. v. 10, p. 211-223. 1999.

COLLINS, L.; PENNY, D. Complex spliceosomal organization ancestral to extant eukaryotes. **Mol. Biol. Evol.** v. 22, p. 1053 – 1066. 2005.

CONTRERAS, V. T.; MOREL, C.; GOLDENBERG, S. Stage specific gene expression precedes morphological changes during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 14, p. 83-96. 1985a.

CONTRERAS, V.T.; SALLES, J.M.; THOMAS, N.; MOREL, C.N.; GOLDENBERG, S. *In vitro* differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 16, p. 315-327. 1985b.

COOK, A.; FULVIA, B.; JINEK, M.; CONTI, E. Structural Biology of Nucleocytoplasmic Transport. **Ann. Rev. Biochem.** v. 76, p. 647-71. 2007.

CORDIN, O.; BANROQUES, J.; TANNER, N.K.; LINDER, P. The DEAD-box protein family of RNA helicases. **Gene.** v. 367, p. 17-37. 2006.

COUTAVAS, E.; REN, M.; OPPENHEIM, J. D.; D'EUSTACHIO, P.; RUSH, M. G. Characterization of proteins that interact with the cell-cycle regulatory protein Ran/TC4. **Nature.** v. 366, p. 585-58. 1993.

CROWE, J.; MASONE, B.S.; RIBBE, J. One-step purification of recombinant proteins with the 6xHis tag Ni-NTA resin. **Mol. Biotech.** v. 4, p. 247:257. 1995.

CREMER, T.; CREMER, C. Chromosome Territories, Nuclear Architecture and Gene Regulation in Mammalian Cells. **Nature Reviews.** v. 2, n. 4, p. 292-301. 2001.

CUEVAS, I.C.; FRASCH, A.C.; D'ORSO, I. Insights into a CRM1-mediated RNA-nuclear export pathway in *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 139, p. 15-24. 2005.

CULLEN, B.R. Nuclear RNA export. **Journal of Cell Science.** v. 116, p. 587-597. 2003.

CUSTÓDIO, N.; CARVALHO, C.; CONDADO, I.; ANTONIOU, M.; BLENCOWE, B.J.; CARMO-FONSECA, M. In vivo recruitment of exon junction complex proteins to transcription sites in mammalian cell nuclei. **RNA.** v. 10, n. 4, p. 622-33. 2004.

DA ROCHA, W.; OTSU, K.; TEIXEIRA, S.M.R.; DONELSON, J.E. Tests of cytoplasmic RNA interference (RNAi) and construction of a tetracycline-inducible T7

promoter system in *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol.** v. 133, n. 2, p. 175-186. 2003.

DAR-DER, J.; SULTAN, A.A.K.; CHAKRABARTI, D.; HORROCKS, P.; DOERIG, C.; ARNOT, D.E. An RCC1-type guanidine exchange factor for the Ran G protein is found in the *Plasmodium falciparum* nucleus. **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 95, p. 165-170. 1998.

DE GAUDENZI, J. G.; D'ORSO, I.; FRASCH, A.C. RNA Recognition Motif-type RNA-binding Proteins in *Trypanosoma cruzi* Form a Family Involved in the Interaction with Specific Transcripts *in vivo*. **J. Biol Chem.** v. 278, p. 18884-18894. 2003.

DE GAUDENZI, J. G.; FRASCH A.C.; CLAYTON, C. RNA-binding domain proteins in kinetoplastids: a comparative analysis. **Eukaryotic Cell.** v. 4, p. 2106-2114. 2005.

DEGRASSE, J. A.; DUBOIS, K.N.; DEVOS, D.; SIEGEL, T. N.; SALI, A.; FIELD, M. C.; ROUT, M.P.; CHAIT B.T. Evidence for a shared nuclear pore complex architecture that is conserved from the last common eukaryotic ancestor. **Molecular Biology.** V. 8, n. 9, p. 2119-30. 2009.

DE LANGE, T.; BERKVEN, T.M.; VEERMAN, H.J.; FRASCH, A.C.; BARRY, J.D.; BORST, P. Comparison of the genes coding for the common 5' terminal sequence of messenger RNAs in three trypanosome species. **Nucleic Acids Res.** v.12, p. 4431-4443. 1984.

DIAS, J.C.P. Epidemiologia. Em: *Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas. Zigman Brener; Zilton Andrade; Manoel Barral-Neto 2. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2000.

DJIKENG, A.; SHI, H.; TSCHUDI, C.; ULLU, E. RNA interference in *Trypanosoma brucei*: cloning of small interfering RNAs provides evidence for retroposon-derived 24–26- nucleotide RNAs. **RNA.** v. 7, p. 1522–1530. 2001.

DOSSIN, F.M.; SCHENKMAN, S. Actively Transcribing RNA Polymerase II Concentrates on Spliced Leader Genes in the Nucleus of *Trypanosoma cruzi*. **Eukaryotic Cell.** v. 4, p. 960-970. 2005.

D'ORSO, I.; FRASCH, A.C. TcUBP-1, a Developmentally Regulated U-rich RNA-binding Protein Involved in Selective mRNA Destabilization in Trypanosomes. **J. Biol. Chem.** v. 276, n. 37, p. 34801-34809. 2001.

D'ORSO, I.; DEGAUDENZI, J.G.; FRASCH, A.C. RNA-binding proteins and mRNA turnover in trypanosomes. **TRENDS in Parasitology**. v. 19, p.151-155. 2003.

DREYFUSS, G.; KIM V. N.; KATAOKA, N. Messenger-RNA binding proteins and the messages they carry. **Nar. Rev. Mol. Cell. Biol.** v. 3, p. 195-205. 2002.

DU, T.G.; SCHIMD, M.; JANSEN, R.P. Why cells move messages: The biological functions of mRNA localization. **Semin. Cell. Dev. Biol.** v. 18, p. 171-177. 2007.

EBERL, D.F.; LORENZ, L.J.; MELNICK, M.B.; SOOD, V.; LASKO, P.; PERRIMON, N. A new enhancer of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster* encodes a putative RNA helicase that binds chromosomes and is regulated by the cell cycle. **Genetics**. v. 146, p. 951–963. 1997.

FLECKNER, J.; ZHANG, M.; VALCARCEL, J.; GREEN, M.R. U2AF65 recruits a novel human DEAD box protein required for the U2 snRNP-branchpoint interaction. **Genes & Dev**. v. 11, p. 1864–1872. 1997.

FISCHER, T.; STRÄSSER, K.; RACZ, A.; RODRIGUEZ-NAVARRO, S.; OPIZZI, M.; IHRIG, P.; LECHNER, J.; HURT, E. The mRNA export machinery requires the novel Sac3p–Thp1p complex to dock at the nucleoplasmic entrance of the nuclear pores. **Embo J**. v. 21, p. 5843–5852. 2002.

FRAGOSO, S.P.; GOLDENBERG, S. Cloning and characterization of the gene encoding *Trypanosoma cruzi* DNA topoisomerase II. **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 55, n. 1-2, p. 127-134. 1992.

FRANKEL, M.B.; KNOLL, L.J. Functional analysis of key nuclear trafficking components reveals an atypical Ran network required for parasite pathogenesis. **Mol. Microbiol.** v. 70, n. 2, p. 410-420. 2008.

GADAL, O.; STRAUSS, D.; KESSL, J.; TRUMPOWER, B.; TOLLERVEY, D.; HURT, E. Nuclear export of 60s ribosomal subunits depends on Xpo1p and requires a nuclear export sequence-containing factor, Nmd3p, that associates with the larger subunit protein Rp110p. **Mol. Cell. Biol.** V. 21, n. 10, p. 3405-15. 2001.

GALLOUZI, I.E.; BRENNAN, C.M.; STENBERG, M.G.; SWANSON, M.S.; EVERSOLE, A.; MAIZELS, N.; SIEITZ, J.A. HuR binding to cytoplasmic mRNA is perturbed by heat shock. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 97, p. 3073–8. 2000.

GARCIA, E.S.; AZAMBUJA, P. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. **Parasitol. Today**. v. 7, p. 240-45. 1991.

GATFIELD, D.; LE HIR, H.; SCHMITT, C.; BRAUN, I.C.; KÖCHER, T.; WILM, M.; IZZAURRALDE, E. The DExH/D box protein HEL/UAP56 is essential for mRNA nuclear export in *Drosophila*. **Curr. Biol.** v. 11, n. 21, p. 1716-21. 2001.

GLEIZES, P.E.; NOAILLAC-DEPEYRE, J.; LÉGER-SILVESTRE, I.; TEULIÈRES, F.; DAUXOIS, J.Y.; POMMET, D.; AZUM-GELADE, M.C.; GAS, N. Ultrastructural localization of rRNA shows defective nuclear export of preribosomes in mutants of the Nup82p complex. **J Cell Biol.** v. 155, n. 6, p. 923–936. 2001.

GLISOVIC, T.; BACHORIK, J.L.; YONG, J.; DREYFUSS, G. RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. **FEBS Lett.** v.14, p.1977-86. 2008.

GOLDENBERG, S.; CONTRERAS, V.T.; SALLES, J.M.; FRANCO, M.P.A.L.; BONALDO, M.C.; VALLE, D.; GONÇALVES, A.M.; MOREL, C.M. Perspectives of vaccination against Chagas Disease through biotechnology. II – Gene expression in *T. cruzi* trypomastigotes and cell-free translation of mRNAs coding for relevant surface antigens. In: **New Approaches to Vaccine Development**. TORRIGIANI, O. (Ed). Schwabe e Co., Basel, Switzerland, p. 442-459. 1984.

GOLDENBERG, S.; CONTRERAS, V.T.; BONALDO, M.C.; SALLES, J.M.; FRANCO, M.P.A.L.; LAFAILLE, J.; GONZALES-PERDOMO, M.; LINSS, J.; MOREL, C.M. *In vitro* differentiation systems for the study of differential gene expression during *Trypanosoma cruzi* development. In: **Molecular Strategies of Parasitic Invasion**. 203-212. 1987.

GONZALEZ, M.S.; NOGUEIRA, N.F.; MELLO, C.B.; DE SOUZA W.; SCHAUB, G.A.; AZAMBUJA, P.; GARCIA, E.S. Influence of brain and azadirachtin on *Trypanosoma cruzi* development in the vector, *Rhodnius prolixus*. **Exp. Parasitol.** v. 92, p. 100-108. 1999.

GONZÁLEZ-AGUILERA, C.; TOUS, C.; GÓMEZ-GONZÁLEZ, B.; HUERTAS, P.; LUNA, R.; AGUILERA, A. The THP1-SAC3-SUS1-CDC31 Complex Works in Transcription Elongation-mRNA Export Preventing RNA-mediated Genome Instability **Molecular Biology of the Cell**. v. 19, p. 4310-4318. 2008.

GRAVELEY, B.R. Sorting out the complexity of SR protein functions. **RNA**. v. 6, p. 1197–1211. 2000.

GROSSHANS, H.; HURT, E.; SIMOS, G. An aminoacylation-dependent nuclear tRNA export pathway in yeast. **Genes Dev.** v. 14, p. 830-840. 2000.

GRÜTER, P.; TABERNERO, C.; VON KOBBE, C.; SCHMITT, C.; SAAVEDRA, C.; BACHI, A.; WILM, M.; FELBER, B.K.; IZAURRALDE, E. TAP, the human homolog of Mex67p, mediates CTE-dependent RNA export from the nucleus. **Mol. Cell** . v. 1, n. 5, p. 649–659. 1998.

HEROLD, A.; TEIXEIRA, L.; IZAURRALDE, E. Genome-wide analysis of nuclear mRNA export pathways in *Drosophila*. **EMBO J.** v. 22, p. 2472–2483. 2003.

HIDE, G. History of Sleeping Sickness in East Africa. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 12, n. 1, p. 112-25. 1999.

HO, J. H.; KALLSTROM G.; JOHNSON. A.W. Nmd3 is a Crm1p-dependent adapter protein for nuclear export of the large ribosomal subunit. **J. Cell. Biol.** v. 151, n. 5, p.1057-1066. 2000.

HOARE, C.A.; WALLACE, F.G. Developmental Stages of Trypanosomatid Flagellates; a New Terminology. **Nature.** v. 212, p. 1385-1386. 1966.

HOLETZ, F.B.; CORREA, A.; AVILA, A.R.; NAKAMURA, C.V.; KRIEGER, M.A.; GOLDENBERG, S. Evidence of P-body-like structures in *Trypanosoma cruzi*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 356, n. 4; p. 1062-1067. 2007.

HUANG, Y.; STEITZ, J.A. *Splicing* factors SRp20 and 9G8 promote the nucleocytoplasmatic export of mRNA. **Mol. Cell.** v. 7, p. 899-905. 2001.

HUANG, Y.; YARIO, T.A.; STEITZ, J.A. A molecular link between SR protein dephosphorylation and mRNA export. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 101, p. 9666-9670. 2004.

HUG, M.; HOTZ, H.R.; HARTMANN, C.; CLAYTON, C. Hierarchies of RNA-processing signals in a trypanosome surface antigen mRNA precursor. **Mol. Cell. Biol.** v. 14, p. 7428-7435. 1994.

HURT, D.J.; WANG, S.S.; LIN, Y.H.; HOPPER, A.K. Cloning and characterization of LOS1, a *Saccharomyces cerevisiae* gene that affects tRNA *splicing*. **Mol. Cell. Biol.** v. 7, p. 208– 1216. 1987.



HUTTEN, S.; KEHLENBACH, R. H. CRM1-mediated nuclear export: to the pore and beyond. **TRENDS in Cell Biology**. v. 17, n. 4, p. 193-201. 2007.

IBORRA, F.J.; POMBO, A.; JACKSON, D.; COOK, P. Active RNA polymerases are localized within discrete transcription ' factories ' in human nuclei. **J. Cell Sci**. v. 109 , p. 1427 – 1436. 1996.

IGLESIAS, N.; STUTZ, F. Regulation of mRNP dynamics along the export pathway. **FEBS Letters**. v. 582, p. 1987–1996. 2008.

IKUTA, T.; EGUCHI, H.; TACHIBANA, T.; YONEDA, Y.; KAWAJIRI, K. Nuclear localization and export signals of the human aryl hydrocarbon receptor. **J. Biol. Hem**. v. 273, p. 2895-2904. 1998.

IZAURRALDE, E.; JARMOLOWSKI, A.; BEISEL, C.; MATTAJ, I.W.; DREYFUSS, G.; FISCHER U. A Role for the M9 Transport Signal of hnRNP A1 in mRNA Nuclear Export. **The Journal of Cell Biology**. v. 137, p. 27-35. 1997.

JEKELY, G. Small GTPases and the evolution of the eukaryotic cell. **Bioessays**. v. 25, p. 1129–38. 2003.

JENSEN, T.H.; BOULAY, J.; ROSBASH, M.; LIBRI, D. The DECD box putative ATPase Sub2p is an early mRNA export factor. **Curr. Biol**. v. 11, p. 1711–1715. 2001.

JOHNSON, P.J.; KOOTER, J.M.; BORST, P. Inactivation of transcription by UV irradiation of *T. brucei* provides evidence for a multicistronic transcription unit including a VSG gene. **Cell**. v. 51, n. 2, p. :273-81. 1987.

JURICA, M.S.; MOORE, M.J. Pre-mRNA *splicing*: awash in a sea of proteins. **Mol Cell**. v. 12, p. 5-14. 2003.

KAPADIA, F.; PRYOR, A.; CHANG, T.H.; JOHNSON, L.F. Nuclear localization of poly(A)+ mRNA following siRNA reduction of expression of the mammalian RNA helicases UAP56 and URH49. **Gene**. v. 384, p. 37-44. 2006.

KATAHIRA, J.; STRÄSSER, K.; PODTELEJNIKOV, A.; MANN, M.; JUNG, J. U.; HURT, E.. The Mex67p-mediated nuclear mRNA export pathway is conserved from yeast to human. **The EMBO J.** v. 18, n. 9, p. 2593-609. 1999.

KATAOKA, N. ;YONG, J.; KIM, V.N.; VELAZQUEZ, F.; PERKINSON, R.A.; WANG, F.; DREYFUSS, G. Pre-mRNA *splicing* imprints mRNA in the nucleus with a novel RNA-binding protein that persists in the cytoplasm. **Mol. Cell** . v. 6, p. 673–682. 2000.

KEENE, J.D. Ribonucleoprotein infrastructure regulating the flow of genetic information between the genome and the proteome. **Proc.Natl Acad. Sci USA**. v. 98, p. 7018-7024. 2001.

KIESLER, E.; MIRALLES, F.; VISA, N. HEL/UAP56 Binds Cotranscriptionally to the Balbiani Ring Pre-mRNA in an Intron-Independent Manner and Accompanies the BR mRNP to the Nuclear Pore. **Current Biology**. v. 12, p. 859–862. 2002.

KÖHLER, A.; HURT, E. Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. **Nature reviews. Molecular cell biology**. v. 8, n. 10, p. 761-73. 2007.

KOTA, K.P.; WAGNER, S.R.; HUERTA E.; UNDERWOOD, J.M.; NICKERSON, J.A. Binding of ATP to UAP56 is necessary for mRNA export. **Journal of Cell Science** . v. 121, p. 1526-1537. 2008.

KROPF, S.P.; AZEVEDO, N.; FERREIRA, L.O. Doença de Chagas: a construção de um fato científico e de um problema de saúde pública no Brasil. In: **Ciênc.Saúde Coletiva**. v. 5, n. 2. 2000.

KUDO, N.; MATSUMORI, N.; TAOKA, H.; FUJIWARA, D.; SCHREINER, E.P. Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region. **Proc. Natl. Acad. Sci**. v. 96, p. 9112-17. 1999.

KURSHAKOVA, M.M.; KRASNOV, A.N.; KOPYTOVA, D.V.; SHIDLOVSKII, Y.V.; NIKOLENKO, J.V.; NABIROCHKINA, E.N.; SPEHNER, D.; SCHULTZ, P.; TORA, L.; GEORGIEVA, S.G. SAGA and a novel Drosophila export complex anchor efficient transcription and mRNA export to NPC. **EMBO J**. v. 26, n.24, p. 4956-65. 2007.

LANAR, D.E. Growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi* cultivated with a *Triatoma infestans* embryo cell line. **J. Protozool**. v. 26, n. 3, p. 457-462. 1979.

LARANJA, F.S.; DIAS, E.; NÓBREGA, G.; MIRANDA, A. Chagas' Disease: A Clinical, Epidemiologic, and Pathologic Study. **Circulation**. v. 14, p. 1035-60. 1956.

LARANJA, F.S.; ANDRADE, Z.A. Forma crônica cardíaca da doença de Chagas no cão. **Arq Bras Cardiol** . v. 35. p. 377-380. 1980.

LAUFER, G.; SCHAAF, G.; BOLLGONN, S.; GÜNZL, A. *In vitro* analysis of  $\alpha$ -amanitin-resistant transcription from the rRNA, procyclic acidic repetitive protein and variant surface glycoprotein gene promoters in *Trypanosoma brucei*. **Mol. Cell Biol.** v. 19, p. 5466-73. 1999.

LEBOWITZ, J.H.; SMITH, H.Q.; RUSCHE, L.; BEVERLEY, S.M. Coupling of poly(A) site selection and *trans splicing* in *Leishmania*. **Genes and Development**. v. 7, p. 996-1007. 1993.

LENZI, H. L.; OLIVEIRA, D. N.; LIMA, M. T.; GATASS, C. R. *Trypanosoma cruzi*: paninfectivity of CL strain during murine acute infection. **Experimental Parasitology**. v. 84, p. 16-27. 1996.

LEVINE, N.D.; CORLISS, J.O.; COX, F.E.; DEROUX, G.; GRAIN, J.; HONIGBERG, B.M.; LEEDALE, G.F.; LOEBLICH, A.R.; LOM, J.; LYNN, D.; MERINFELD, E.G.; PAGE, F.C.; POLIANSKY, G.; SPRAGUE, V.; VAVRA, J.; WALLACE, F.G. A newly revised classification of the Protozoa. **J. Protozool.** v. 27, n. 1, p. 37-58. 1980.

LIANG, X.H.; HARITAN, A.; ULIEL, S.; MICHAELI, S. *trans* and *cis Splicing* in Trypanosomatids: Mechanism, Factors and Regulation. **Eukaryot Cell**. v. 2, p. 830-840. 2003.

LI, J.; CHEN, X. PAUSED, a putative exportin-t, acts pleiotropically in Arabidopsis development but is dispensable for viability. **Plant Physiol.** v. 132, p. 1913–1924. 2003.

LI, H.; TSCHUDI, C. Novel and essential subunits in the 300-kilodalton nuclear cap binding complex of *Trypanosoma brucei*. **Mol. Cell. Biol.** v. 25, p. 2216–26. 2005.

LIBRI, D.; GRAZIANI, N.; SAGUEZ, C.; BOULAY, J. Multiple roles for the yeast SUB2/yUAP56 gene in *splicing*, **Genes Dev.** v. 15. p. 36–41. 2001.

LIN, W.C.; LI, S.C.; SHIN, J.W.; HU, S.N.; YU X.M.; HUANG, T.Y.; CHEN, S.C.; CHEN, H.C.; CHEN, S.J.; HUANG, P.J.; GAN, R.R.; CHIU, C.H.; TANG, P. Identification of microRNA in the protist *Trichomonas vaginalis*. **Genomics**. v. 3, p. 487–493. 2009.

MACMORRIS, M.; BROCKER C., BLUMENTHAL T. UAP56 levels affect viability and mRNA export in *Caenorhabditis elegans*. **RNA**. v. 9, p. 847–857. 2003.

MACRAE, J.I.; OBADO, S.O.; TURNOCK, D.C.; ROPER, J.R.; KIERANS, M.; KELLY, J.M.; FERGUSON, M.A. The suppression of galactose metabolism in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes causes changes in cell surface molecular architecture and cell morphology. **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 147, n. 1, p. 126-36. 2006.

MAIR, G.; SHI, H.; LI, H.; DJIKENG, A.; AVILES, H.O.; BISHOP, J.R.; FALCONE, F.H.; GAVRILESCU, C.; MONTGOMERY, J.L.; SANTORI, M.I.; STERN, L.S.; WANG, Z.; ULLU, E.; TSCHUDI, C. A new twist in trypanosome RNA metabolism: *cis-splicing* of pre-mRNA. **RNA**. v. 6, n. 2. p. 163-9. 2000.

MATERA, A.G.; TERNS, R.M.; TERNS, M.P. Non-coding RNAs: lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs. **Nature**. v. 8, p. 209-220. 2007.

MATTHEWS, K.R.; TSCHUDI, C.; ULLU, E. A common pyrimidine-rich motif governs *trans-splicing* and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes. **Genes and Development**. v. 8, p. 491-501. 1994.

MCGUIRE, A. T.; MANGROO, D. Cex1p is a novel cytoplasmic component of the *Saccharomyces cerevisiae* nuclear tRNA export machinery. **EMBO J.** v. 26, p. 288–300. 2007.

MCGUFFIN L.J.; JONES, D.T. Improvement of the GenTHREADER method for genomic fold recognition. **Bioinformatics**. v. 19. p. 874-881. 2003.

MEYER H, DE SOUZA W. Electron microscopic study of *Trypanosoma cruzi* periplast in tissue cultures. I. Number and arrangement of the peripheral microtubules in the various forms of the parasite's life cycle. **J. Protozool.** v. 23, .n. 3, p. 385-90. 1976.

MOY, T.I., SILVER, P.A. Nuclear export of the small ribosomal subunit requires the ran-GTPase cycle and certain nucleoporins. **Genes Dev.** v. 13, p. 2118-2133. 1999.

MURPHY, D.; DANCIS, B.; BROWN, J.R. The evolution of core proteins involved in microRNA biogenesis. **BMC. Evol. Biol.** v. 8, n. 92. p. 1471-2148. 2008.

NAKIELNY, S.; DREYFUSS, G. Transport of Proteins and RNAs in and out of the Nucleus. **Cell**. v. 99, p. 677–690. 1999.

NARDELLI, S. C.; AVILA, A.R.; FREUND, A.; MOTTA, M.C.; MANHAES, L.; DE JESUS, T.C.; SCHENCKMAN, S.; FRAGOSO, S.P.; KRIEGER, M.A.; GOLDENBERG, S.; DALLAGIOVANNA, B. Small-Subunit rRNA Processome Proteins Are Translationally Regulated during Differentiation of *Trypanosoma cruzi*. **Eukaryot Cell**. v. 6, n. 2, p. 337-345. 2007.

NARDELLI, S.C.; CUNHA, J.P.C.; MOTTA, M.C.M.M.; SHENCKMAN, S. Distinct acetylation of *Trypanosoma cruzi* histone H4 during cell cycle, parasite differentiation, and after DNA damage. **Chromosoma**. v. 118, p. 487-499. 2009.

NELSON, R. G.; PARSONS, M.; BARR, P.J.; STUART, K.; SELKIRK, M.; AGABIAN, N. Sequences homologous to the variant antigen mRNA spliced leader are located in tandem repeats and variable orphans in *Trypanosoma brucei*. **Cell**. v. 34, p. 901-909. 1983.

NEVILLE, M.; ROSBASH, M. The NES-Crm1p export pathway is not a major mRNA export route in *Saccharomyces cerevisiae*. **The EMBO J.** v. 18, n. 13, p. 3746 - 3756. 1999.

NIELSEN, J.A.; HUDSON, L.D.; ARMSTRONG, R.C. Nuclear organization in differentiating oligodendrocytes. **J. Cell Sci.** v. 115, p. 4071 – 4079. 2002.

NOZAKI, T.; CROSS, G.A.M. Effects of 3' untranslated and intergenic regions on gene expression in *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 75, p. 55-67. 1995.

OHNO, M.; SEGREF, A.; BACHI, A.; WILM, M.; MATTAJ, W. PHAX, a Mediator of U snRNA nuclear export whose activity is regulated by phosphorylation. **Cell**. v. 101, p. 187-198. .2000.

PAGE, R.D.M. TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. **Oxford University Press**. v. 12, n. 4, p. 357-358. 1996.

HAILE, S.; PAPADOPOULOU, B. Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. **Current Opinion in Microbiology**. v. 10, p. 569–577. 2007.

POLLARD, V.W.; MICHAEL, W.M.; NAKIELNY, S.; SIOMI, M.C.; WANG, F.; DREYFUSS, G. A novel receptor-mediated nuclear protein import pathway. **Cell**. v. 86, p. 985-94. 1996.

PROHASKA, K.; WILLIAMS, N. Assembly of the *Trypanosoma brucei* 60S ribosomal subunit nuclear export complex requires trypanosome-specific proteins P34 and P37. **Eukaryotic Cell**. v. 8, n. 1, p. 77-87. 2009.

RASSI, A.; RASSI, JÚNIOR, A.; RASSI, G. G. Fase aguda. Em: *Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas. Zigman Brener; Zilton Andrade; Manoel Barral-Neto 2. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan,. 2000.

REDMOND, S.; VADIVELU, J.; FIELD, M.C. RNAi: an automated web-based tool for the selection of RNAi targets in *Trypanosoma brucei*. **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 128, p. 115–118. 2003.

REED, R.; CHENG, H. TREX, SR proteins and export of mRNA. **Current Opinion in Cell Biology**. v. 17, p. 269-273. 2005.

RIBBECK, K.; LIPOWSKY, G.; KENT, H.M.; STEWART, M.; GORLICH, D. NTF2 mediates nuclear import of Ran. **EMBO J.** v. 17, p. 6587–6598. 1998.

RODRIGUEZ, M. S.; DARGEMONT, C.; STUTZ, F. Nuclear export of RNA. **Biology of the Cell**. v. 96, p. 639–655. 2004.

RODRÍGUEZ-NAVARRO, S.; FISCHER, T.; LUO, M. J.; ANTÚNEZ, O.; BRETTSCHEIDER, S.; LECHNER, J.; PÉREZ-ORTÍN, J. E.; REED, R.; HURT, E. Sus1, a Functional Component of the SAGA Histone Acetylase Complex and the Nuclear Pore-Associated mRNA Export Machinery. **Cell**. v. 116, p. 75–86. 2004.

RODRÍGUEZ-NAVARRO, S. Insights into SAGA function during gene expression. **EMBO REPORTS**. v. 10, n. 8, p. 843-50. 2009.

ROGER, A.J.; HUG, L.A. The origin and diversification of eukaryotes: problems with molecular phylogenetics and molecular clock estimation. **Phil. Trans. R. Soc. B.** v. 361, p. 1039-1054. 2006.

RONDINELLI, E.; SILVA, R.; CARVALHO, J.F.O.; SOARES, C.M.A.; CARVALHO, E.F.; CASTRO, F.T. *Trypanosoma cruzi*: an *in vitro* cycle of cell differentiation in axenic culture. **Exp. Parasitol.** v. 66, p. 197-204. 1988.

ROUT, M.P.; FIELD, M.C. Isolation and Characterization of Subnuclear Compartments from *Trypanosoma brucei*. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 41, p. 38261-38271. 2001.

SAHNI, A.; WANG, N.; ALEXIS, J.D. UAP56 is an important regulator of protein synthesis and growth in cardiomyocytes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** [Epub ahead of print] . 2010.

SALI, A.; BLUNDELL, T.L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. **J. Mol. Biol.** v. 234, p. 779–815. 1993.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. **Cold Spring Harbor Laboratory**. 2<sup>nd</sup>Ed. 2001.

SANFORD, J.; BRUZIK, J.P. Regulation of SR protein localization during development. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 98, p. 10184–10189. 2001.

SANTOS-ROSA, H.; MORENO, H.; SIMOS, G.; SEGREF, A.; FAHRENKROG, B.; PANTÉ, N.; HURT, E. Nuclear mRNA export requires complex formation between Mex67p and Mtr2p at the nuclear pores. **Mol. Cell. Biol.** v. 18, p. 6826–6838. 1998.

SARKAR, S.; HOPPER, A.K. tRNA Nuclear Export in *Saccharomyces cerevisiae*: In Situ Hybridization Analysis. **Mol. Biol. Cell.** v. 9, n. 11, p. 3041-3055. 1998.

SCHMUNIS, G.A. A tripanossomíase americana e seu impacto na saúde pública das Américas. Em: *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas: Zigman Brener, Zilton , Andrade; Manoel Barral-Neto. 2 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2000.

SEGREF, A.; SHARMA, K.; DOYE, V.; HELLWIG, A.; HUBER, J.; LÜHRMANN, R.; HURT, E. C. Mex67p a novel factor for nuclear mRNA export binds to both Poly(A)<sup>+</sup> RNA and nuclear pores. **EMBO J.** v. 16, p. 3256-3271. 1997.

SCHMITT, C.; VON KOBBE, C.; BACHI, A.; PANTÉ, N.; RODRIGUES, J.P.; BOSCHERON, C.; RIGAUT, G.; WILM, M.; SÉRAPHIN, B.; CARMO-FONSECA, M.; IZAURRALDE, E. Dbp5, a DEAD-box protein required for mRNA export, is recruited to the cytoplasmic fibrils of nuclear pore complex via a conserved interaction with CAN/Nup159p. **EMBO J.** v. 18, n. 15, p. 4332-47. 1999.

SCHÜTZ, S.; CHEMNITZ, J.; SPILLNER, C.; FROHME, M.; HAUBE, J.; KEHLENBACH, R.H. Stimulated expression of mRNAs in activated T cells depends on a functional CRM1 nuclear export pathway. **J. Mol. Biol.** v. 358, p. 997–1009. 2006.

SCHWEDE, A.; MANFUL, T.; JHA, B.A.; HELBIG, C.; BERCOVICH, N.; STEWART, M.; CLAYTON, C. The role of deadenylation in the degradation of unstable mRNAs in trypanosomes. **Nucleic Acid Research**. V. 37, n. 16; p. 5511-5528. 2009.

SHAPIRO, T.A.; ENGLUND, P.T. The Structure and Replication of Kinetoplast DNA. **Annu. Rev. Microbiol.** v. 49, p. 117-43. 1995.

SHANKAR, J.; PRADHAN, A.; TUTEJA, R. Isolation and characterization of *Plasmodium falciparum* UAP56 homolog: Evidence for the coupling of RNA binding and *splicing* activity by site-directed mutations. **Archives of Biochemistry and Biophysics** . v. 478, p. 143–153. 2008.

SHIBATA, S.; SASAKI, M.; MIKI, T.; SHIMAMOTO, A.; FURUICHI, Y.; KATAHIRA, J.; YONEDA, Y. Exportin-5 orthologues are functionally divergent among species. **Nucleic acids research**. v. 34, n. 17, p. 4711-21. 2006.

SHOPLAND, L.S.; JOHNSON, C.V.; BYRON, M., MCNEIL, J., LAWRENCE, J.B. Clustering of multiple specific genes and gene-rich R-bands around SC-35 domains: evidence for local euchromatic neighborhoods. **J. Cell Biol.** v. 162, p. 981 – 990. 2003.

SMIRLIS, D.; BOLETI, H.; GAITANOU, M.; SOTO, M.; SOTERIADOU, K. *Leishmania donovani* Ran-GTPase interacts at the nuclear rim with linker Histone H1. **Biochemical Journal**. v. 424, n. 3, p. 367-74. 2009.

SOUZA, W. A Short Review on the Morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v. 94, p. 17-36. 1999.

SOUZA, W. Basic Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Current Pharmaceutical Design**. v. 8, p. 269-285. 2002.

SOUZA F.S.P. Caracterização da TCKAP3, Uma proteína associada ao cinetoplasto de *Tryposoma cruzi*. 105 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

SOUTHERN, E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments by gel electrophoresis. **J. Mol. Biol.** v. 98, p. 503-517. 1975.



SPECTOR, D.L. The dynamics of chromosome organization and gene regulation. **Annu. Rev. Biochem.** v. 72, p. 573–608. 2003.

STEINER-MOSONYI, M.; MANGROO, D. The nuclear tRNA aminoacylation-dependent pathway may be the principal route used to export tRNA from the nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemical Society.** v. 378, p. 809–816. 2004.

STEWART, M. Insights into the Molecular Mechanism of Nuclear Trafficking Using Nuclear Transport Factor 2 (NTF2). **Cell Struct. Funct.** v. 25, p. 217–25. 2000.

STOFFLER, D.; FAHRENKOG, B.; AEBI, U. The nuclear pore complex: from molecular architecture to functional dynamics. **Curr. Opin. Cell. Biol.** v. 11, p. 391–401. 1999.

STRÄSSER, K.; HURT, E. *Splicing* factor Sub2p is required for nuclear mRNA export through its interaction with Yra1p. **Nature.** v. 6856, p. 648–52. 2001.

STRÄSSER, K.; MASUDA, S.; MASON, P.; PFANNSTIEL, J.; OPPIZZI, M.; RODRIGUEZ-NAVARRO, S.; RONDÓN, A.G.; AGUILERA, A.; STRUHL, K.; REED, R.; HURT, E. TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export. **Nature.** v. 417, p. 304–308. 2002.

STRÖM, A.C.; WEIS, K. Importin-beta-like nuclear transport receptors. **Genome Biol.** v. 2, n. 6, p. 1–9. 2001.

TALCOTT, B.; MOORE, M.S. Getting across the nuclear pore complex. **Trends Cell Biol.** v. 9, p. 312–318. 1999.

TAKAHASHI, N.; TAKAHASHI, Y.; PUTMAN, F.W. Periodicity of leucine and tandem repetition of segment in the primary structure of leucine-rich  $\alpha_2$ -glycoprotein of human serum. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 82, p. 1906–1910. 1985.

TAKANO, A.; ENDO, T.; YOSHIHISA, T. tRNA actively shuttles between the nucleus and cytosol in yeast. **Science.** v. 309, p. 140–142. 2005.

TANOWITZ, H.B.; KIRCHHOFF, L.V.; SIMON, D.; MORRIS, S.A.; WEISS, L.M.; WITTNER, M. Chagas' disease. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 5, n. 4, p. 400–19. 1992.

TEIXEIRA, S.M.R. Control of gene expression in Trypanosomatidae. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 31, p. 1503-1516. 1998.

TEIXEIRA, S.M.; DAROCHA, W.D. Control of gene expression and genetic manipulation in the Trypanosomatidae. **Genet. Mol. Res.** v. 2, n. 1, p. 148-58. 2003.

TEIXEIRA, A.R.; NASCIMENTO, R.J.; STURM, N.R. Evolution and pathology in chagas disease – a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v. 101, n. 5, p. 463-91. 2006.

TELLERIA, J.; LAFAY, B.; VIRREIRA, M.; BARNABÉ, C.; TIBAYRENC, M.; SVOBODA, M. *Trypanosoma cruzi*: Sequence analysis of the variable region of kinetoplast minicircles. **Exp. Parasitol.** v. 114, p. 279–88. 2006.

THAKURTA, A.G.; WHALEN, W.A.; YOON, J.H.; BHARATHI, A.; KOZAK, L.; WHITEFORD, C.; LOVE D.C.; HANOVER, J.A.; DHAR, R. Crp79p, like Mex67p, is an auxiliary mRNA export factor in *Schizosaccharomyces pombe*. **Mol Biol Cell**. v. 13, n. 8, p.2571-84. 2002.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**. v. 22, n. 22, p. 4673-4680. 1994.

TIMMERS, H.T.M.; TORA, L. SAGA unveiled. **Trends in Biochemical Sciences**. v. 30, n. 1, p. 7-10. 2005.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to Nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 76, n. 9, p. 4350-4354. 1979.

VAN DER PLOEG, L.H.T.; LIU, A.Y.C.; MICHELS, P.A.M.; DE LANGE, T.; BORST, P.; MAJUMDER, H.K.; WEBER, H.; VEENEMANT, G.H.; VAN BOOMT, G.H. RNA *splicing* is required to make the messenger RNA for a variant surface antigen in trypanosomes. **Nucleic Acids Research**. v. 10, p. 3591-3604. 1982.

VANHAMME, L.; PAYS, E. Control of gene expression in trypanosomes. **Microbiol. Rev.** v. 59, n. 2, p. 223-40. 1995.

VERSCHURE, P.J.; VAN DER KRAAN, I.; MANDERS, E.M.M.; VAN DRIEL, R. Spatial Relationship between Transcription Sites and Chromosome Territories. **The Journal of Cell Biology**. v. 147, n. 1, p. 13-24. 1999.

WAHL, M.C.; WILL, C.L.; LÜHRMANN, R. The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. **Cell**. v. 136, n. 4, p. 701-18. 2009.

WATKINS, N.J.; LEMM, I.; LÜHRMANN, R. Involvement of nuclear import and export factors in U8 box C/D snoRNP biogenesis. **Mol Cell Biol**. v. 27, n. 20, p. 7018-27. 2007.

WESTBROOK, J.; FENG, Z.; JAIN, S.; BHAT, T. N.; THANKI, N.; RAVICHANDRAN, V.; GILLILAND, G. L.; BLUHM, W.; WEISSIG, H.; GREER, D. S.; BOURNE, P. E.; BERMAN, H. M. The Protein Data Bank: unifying the archive. **Nucleic Acids Res**. v. 30, n. 1, p. 245-248. 2002.

WICKSTEAD, B.; ERSFELD, K.; GULL, K. Targeting of a tetracycline-inducible expression system to the transcriptionally silent minichromosomes of *Trypanosoma brucei*. **Mol. Biochem. Parasitol**. v. 125, p. 211–216. 2002.

WIRTZ, E.; LEAL, S.; OCHATT, C.; CROSS, G.A.M. A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*. **Mol. Biochem. Parasitol**. v. 99, p. 89–101. 1998.

WHO - BULLETIN OF THE WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas: one hundred years later. **Bull World Health Organ**. v. 87, p. 7. 2009.

YAO, W.; ROSER, D.; KÖHLER, A.; BRADATSCH, B.; BASSLER, J.,; HURT, E. Nuclear export of ribosomal 60S subunits by the general mRNA export receptor Mex67-Mtr2. **Mol. Cell**. v. 26, p. 51–62. 2007.

YONEDA, Y.; HIEDA, M.; NAGOSHI, E.; MYIAMOTO, Y. Nucleocytoplasmic Protein Transport and Recycling of Ran. **Cell Structure and Function**. v. 24, p. 425-433. 1999.

YONEDA, Y. Nucleocytoplasmic protein traffic and its significance to cell function. **Genes Cells**. v. 5, n. 10, p. 777-787. 2000.

ZHAO, J.; JIN, S.B.; BJORKROTH, B.; WIESLANDER, L.; DANEHOLT, B. The mRNA export factor Dbp5 is associated with Balbiani ring mRNP from gene to cytoplasm. **EMBO J**. v. 21, n. 5, p. 1177–1187. 2002.

ZHAO, R.; BODNAR, M.S.; SPECTOR, D.L. Nuclear neighborhoods and gene expression. **Curr Opin Genet Dev.** v. 19, n. 2, 172–179. 2009.